P 11

annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
- 4 DEC. 1978
RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
- 4 DEC. 1978

3e Symposium international d'Œnologie

Bordeaux 21-25 Juin 1977

Trimestriel

1978

Vol. 27 - N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Ann. Technol. Agric. ATAPAA (1) 1-444 (1978)
FR ISSN 0003-4223

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS, Tél. : 551-41-09.

Directeur général : R. FÉVRIER

Directeur général adjoint : J. POLY

Inspecteurs généraux : R. BOUCHET, P. BOUVAREL, C. CALET, A. CAUDERON, G. FAUCONNEAU, G. JOLIVET, R. PÉRO

Rédaction des Annales

Pour l'ensemble des Séries : J. POLY

Annales agronomiques.

— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— M. HALLAIRE, Chef du Département de Bioclimatologie, C.N.R.A.

Annales de l'Amélioration des Plantes.

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., 11, rue Jean-Nicot 75007 Paris.

Annales de Phytopathologie.

— J. PONCHET, Chef du Département de Pathologie végétale, 06602 Antibes.

Annales de Zoologie-Écologie animale.

— B. HURPIN, Chef du Département de Recherches Zoologie, 78280 Guyancourt.

Annales de Zootechnie.

— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C.N.R.Z.

Annales de Technologie agricole.

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C.E.R.D.I.A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C.N.R.Z.
— A. BOURDET, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A., 16, rue N.-Fortin, 75013 Paris.

Annales des Sciences forestières.

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C.N.R.F.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production, C.N.R.F.

Annales de Génétique et de Sélection animale.

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle, C.N.R.Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C.N.R.Z.

Apidologie (Revue franco-allemande, co-édition I.N.R.A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures-sur-Yvette.

Annales de Recherches vétérinaires.

— P. LARVOR, Directeur du laboratoire des Maladies métaboliques, Theix, Saint-Genès-Champanelle, 63110 Beaumont.

Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique.

C.THIBAULT, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A.
Administration et secrétariat de la Rédaction à l'adresse suivante : Secrétariat des A.B.A.B.B., C.N.R.Z., 78350 JOUY-EN-JOSAS.

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I.N.R.A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-22

annales de technologie agricole

3e Symposium international d'Œnologie

Bordeaux 21-25 Juin 1977

Trimestriel

1978

Vol. 27 - N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Les conditions naturelles et humaines
de la qualité des vins

Création et maintien
des vignobles de qualité

Techniques de vinification
et de conservation des vins de qualité

Définition et appréciation de la qualité

Organisé par

L'INSTITUT D'ŒNOLOGIE

la Station Agronomique et Œnologique
l'Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération, 33405 TALENCE

Création et maintien des vignobles de qualité

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 3-13.

Les conditions historiques et géographiques de la naissance des grands crus au XVIIIe siècle

R. PIJASSOU

Institut de Géographie et d'Études Régionales de Bordeaux
Université de Bordeaux III (France)

Résumé

Si les origines du vignoble bordelais plongent dans un lointain passé, la promotion qualitative de ses vins date du XVIIIe siècle. Le claret médiéval, élaboré essentiellement dans les Graves proches de la ville, exporté en masse en Angleterre, était un bon vin ordinaire « pur, net, nouveau et marchand ». On ne savait pas, alors, le faire vieillir. Dans la deuxième moitié du XVIIe siècle, de nombreuses boissons exotiques concurrentes, les vins ibériques, les « black wines » diffusés en Europe occidentale par les Hollandais, transformèrent les conditions du marché des vins de Bordeaux; de plus, de lourds droits de douane rendirent encore plus difficile, aux clarets traditionnels, l'accès du marché britannique. Pour répondre au goût nouveau des classes dirigeantes anglaises, les Pontac, à Haut-Brion, en premier lieu, l'aristocratie parlementaire de Bordeaux à leur suite, créèrent des vins d'un type nouveau, les « New French Clarets », les grands crus. Le Médoc, « région pilote », se couvrit de vignes entre 1685 et 1760. Cette colonisation viticole s'effectua dans le cadre de la grande propriété seigneuriale; le château viticole accapara les meilleurs terroirs de graves, ne laissant à la petite propriété paysanne qu'une place réduite. De concert avec le nouveau négoce des Chartrons, de nouvelles techniques de production et de vinification s'élaborèrent lentement en Médoc : réduction des rendements, sélection des récoltes, amélioration de l'encépagement, ouillages, tirages au fin, collages, utilisation de la mèche soufrée, favorisèrent la mise au point des grands crus. Cette « révolution viticole », l'avènement de la qualité, œuvre des « princes des vignes » du Médoc, reposa sur une hiérarchie des terroirs et des crus qu'ils produisent; elle s'accomplit dans les soixante-quinze premières années du XVIIIe siècle.

Mots clés : *Vignoble bordelais — promotion qualitative — historique — géographie.*

Introduction

Il est traditionnel de considérer que, depuis l'antiquité romaine, de nombreux vignobles de l'aire géographique méditerranéenne produisirent des vins de haute qualité; les grands crus : ainsi, le Falerne, particulièrement apprécié de l'aristo-

cratie romaine, aurait présenté les qualités des grands vins. Ne le conservait-on pas dans des amphores? Ce qu'on oublie parfois de dire, c'est qu'il fallait ajouter des aromates divers, voire de la poix, pour assurer sa conservation. Ce « vinum picatum », ce « vin poissé » ne satisferait sûrement pas les dégustateurs contemporains. Les vignobles créés dans la Gaule Romaine des premiers siècles de notre ère, tels celui des Allobroges de Vienne, celui de la Bourgogne d'Autun ou celui de l'Aquitaine bordelaise, auraient, eux aussi, produit des vins « fameux » que nombre d'auteurs assimilent tout naturellement aux grands crus. Ainsi, s'est constituée une sorte de légende dorée qui fait remonter à la plus haute antiquité la création des vins de qualité. Cependant, cette tradition ne résiste pas à un examen attentif des données historiques; l'exemple du vignoble bordelais permet de montrer que la notion de grand vin est apparue voici trois siècles à peine et non pas, comme on l'affirme d'ordinaire, depuis deux millénaires.

Le « Claret » médiéval

Sans doute le vin de Bordeaux a-t-il d'anciennes lettres de noblesse. Les « Bituriges Vivisques » de l'époque romaine ont sûrement acclimaté un cépage illyrien, la « biturica » (Dion, 1959; Étienne, 1962; Enjalbert, 1975), peut-être l'ancêtre de nos cabernets. Une aristocratie locale planta la vigne importée dans ses grands domaines; elle exporta du vin par le port de Bordeaux, l'antique Burdigala. Ainsi, l'apparition de la vigne en Bordelais fut-elle soumise à deux conditions : sélection et choix d'un cépage d'une part, commercialisation des récoltes, par voie maritime, d'autre part. Ces deux traits essentiels se retrouvèrent à l'heure de la naissance des grands crus du Médoc, à l'aube du XVIIIe siècle.

Après l'effondrement du monde antique, au Ve siècle, l'obscurité enveloppe pendant plus de six cents ans le passé viticole du bordelais. En revanche, on sait qu'à dater du XIIIe siècle, la vigne colonisa nombre de terroirs bordelais; les Graves, dans la proche banlieue urbaine devinrent, alors, le berceau du fameux vignoble médiéval de Bordeaux. Jusqu'au milieu du XVe siècle, la Guyenne anglaise, sous l'autorité de son roi-duc, exporta ses « clarets » sur le marché britannique privilégié. Chaque automne, la « flotte du vin » venait jeter l'ancre dans le « port de la lune ». Elle repartait, avant Noël, toutes voiles dehors, et lourdement lestée de barriques et de futailles pleines.

Ces « vins gascons », peu chargés en alcool, légers en couleur, étaient *des vins nouveaux*. A l'époque, les consommateurs britanniques appréciaient le claret « bon, pur, net, nouveau et marchand ». Ces vins jeunes, consommés « en primeur », étaient, comme nous dirions aujourd'hui, de bons vins de table; ils n'étaient en aucun cas comparables à ceux que nous nommons actuellement des « appellations d'origine contrôlée », c'est-à-dire, des vins fins et vieux. Au surplus, les vins médiévaux ne se conservaient pas, car ni les soutirages, ni les « soufrages » n'étaient encore à l'ordre du jour; les futailles, de surcroît, étaient mal entretenues. Aussi, les « vins vieux », c'est-à-dire ceux qui étaient tout au plus âgés d'un an ou, plus rarement de deux, étaient-ils moins prisés que les vins de l'année; il est vrai qu'ils s'aigrissaient en fûts.

Dans ces conditions, la notion de cru et, à plus forte raison, celle de grand cru qui postule une hiérarchisation, c'est-à-dire la notion de terroir particulier, produisant un certain type de vin, était fort imprécise. On ne connaissait que les

« appellations » régionales, de graves, de côtes, de palus. A vrai dire, le client anglais n'attachait pas une grande importance à l'origine locale du vin, comme le montre bien cet exemple daté du 21 juillet 1453 : un marchand britannique payait d'avance, à un habitant de Macau, un tonneau de vin de la prochaine récolte, « de Gravis Vel de Palude, ad libitum », précise le document (Archives départementales de la Gironde). Peu lui importait qu'il provienne des graves ou des palus, pourvu qu'il fut « bon, pur, nouveau et marchand ». Ainsi, lorsque les marchands médiévaux achetaient des clarets, ils ne cherchaient pas à s'assurer de la finesse particulière du cru; plus simplement, ils veillaient à n'acquérir que des vins « droits de goût ». En fait, l'idéal viticole du Moyen Age et du XVIe siècle, ne dépassa pas la notion de « vin de primeur », de « vin marchand ».

Les initiatives des Pontac, à Haut-Brion : terroir et qualité

Une évolution se dessina dans le courant du XVIIe siècle. Dans les Graves, tout d'abord, mais, également, en quelques secteurs du Haut-Médoc, le vignoble étendit lentement ses conquêtes. Le fait nouveau, fut la création de propriétés un peu plus grandes, les « bourdieux », plus nettement orientées vers la production viticole. Dans certaines seigneuries bordelaises on note le passage de l'ancien système féodal de la tenure censitaire à l'exploitation directe. Ces premières esquisses d'un renouveau viticole traduisirent également la pénétration des capitaux urbains dans le vignoble (PIJASSOU, 1978). Mais, on n'avait pas encore pris conscience de la notion de terroir bien délimité et nommément désigné; à plus forte raison, n'avait-on pas établi la relation entre terroir particulier et grand vin. Ce fut, précisément, le mérite de Haut-Brion, dans les Graves de Pessac, d'avoir, dans le dernier tiers du XVIIe siècle, dégagé clairement ces notions nouvelles, vouées au plus grand avenir.

La chance de Haut-Brion, fut d'appartenir, dès le XVIe siècle, à une lignée familiale bordelaise particulièrement entreprenante et qui sut se hisser de la bourgeoisie du négoce à l'aristocratie parlementaire : les Pontac. Ceux-ci rassemblèrent patiemment autour de la « maison noble de Haut-Brion », un vignoble d'une quarantaine d'hectares qui s'individualisait nettement au milieu des tenures morcelées qui l'entouraient. Au début du règne personnel de Louis XIV, le premier Président du Parlement de Bordeaux, Arnaud de Pontac fit connaître, à Londres, les vins de son beau domaine. Tirer de l'anonymat des clarets traditionnels, le produit d'un terroir bien circonscrit, pour le valoriser dans l'esprit des consommateurs, fut une œuvre essentielle de l'histoire viticole bordelaise.

Nous savons qu'en avril 1663, l'écrivain anglais Samuel Pepys, but à la « Taverne du Chêne Royal » à Londres, *un certain vin français appelé Ho Bryan; il a, nous dit-il, un goût excellent et très particulier qui ne ressemble à rien de ce que je connais*. Il apportait, ainsi, le premier témoignage connu de la notoriété des vins de Haut-Brion. Peu après le grand incendie de Londres, de 1666, le fils du premier Président, François-Auguste de Pontac, fonda, dans la capitale britannique un restaurant à la mode qui portait l'enseigne expressive de « Chez Pontac ». Il y traita la haute société anglaise et quelques émigrés français, dont Saint-Evremond, courtier passionné des vins de Champagne; il fait connaître à tous les mérites de son vin de Haut-Brion.

L'un des clients attitrés du restaurant des Pontac à Londres, le célèbre philosophe anglais John Locke, eut l'idée, à l'occasion d'un long séjour en France, de visiter en mai 1677, le vignoble de Haut-Brion. Il en a laissé une description fort intéressante; après avoir localisé les « vignes de Pontac » et évoqué les graves, il ajoute : *Telle est la qualité particulière du sol du vignoble de M. Pontac, près de Bordeaux, que les négociants m'ont assuré que le vin provenant des vignobles les plus proches puisque seulement un simple fossé les sépare, et dont le sol est, en apparence, parfaitement le même, était nettement moins bon* (LOCKE, 1766).

Ainsi, pour la première fois, était mis en valeur le rapport entre un terroir particulier et un vin de qualité. Locke, bien renseigné par les négociants de Bordeaux, attribuait au terroir de Haut-Brion des mérites supérieurs à ceux des crus voisins, si bien que, déjà une hiérarchisation des terroirs apparaissait supportant celle des vins. Bien que la documentation technique soit plus rare, nous savons que les vins de Haut-Brion, dénommés « Grands vins », dès 1689-1690, étaient l'objet de soins de conservation : ouillages et « tirages au fin », c'est-à-dire soutirages fréquents. C'était, là, une première étape de cette mutation qualitative qui allait conduire aux grands vins. Il n'est pas certain qu'on ait déjà saisi, en 1690, les vertus du vieillissement des futurs grands crus; mais il n'est pas douteux que les seigneurs de Haut-Brion avaient bien le souci de proposer à leur clientèle des vins « droits de goût » et sensiblement améliorés par les nouvelles méthodes de l'ouillage et du « tirage au fin ».

L'évolution du goût de la clientèle anglaise

Les initiatives des Pontac répondaient, de plus, à un changement dans le goût de la clientèle britannique. Le siècle de Louis XIV vit se produire une série de transformations qui bouleversèrent le marché des vins rouges au point de rendre très difficile l'écoulement des traditionnels clarets bordelais. Les entreprises de ces hardis novateurs que furent les hommes d'affaires hollandais ne furent pas étrangères à cette grave crise des débouchés.

Les intrépides Hollandais répandirent en Angleterre, surtout, mais également en France et dans les pays de l'Europe du Nord, l'usage des « tisanes coloniales » : chocolat, café et enfin, thé. Ils diffusèrent, également, les nouvelles bières fortes qu'ils mirent au point dans le dernier quart du XVIIe siècle, en industrialisant les meilleurs procédés des brasseurs allemands. Ces nouvelles boissons concurrencèrent sérieusement les clarets gascons et, plus encore ce fut le cas des nouveaux types de vins dont les Hollandais encouragèrent la production : vins blancs doux, plus ou moins mutés et, surtout, vins rouges plus alcoolisés, plus colorés, aussi, que les clarets bordelais, tels que les « vins noirs » de Cahors et les vins espagnols de Malaga, d'Alicante, des Canaries, sans oublier les vins blancs de Jerez. Les vignobles espagnols ne suffisant plus à l'approvisionnement de l'Angleterre et des pays du Nord, les Hollandais mirent à contribution des régions viticoles du Portugal. Aussi, importèrent-ils quelques vins blancs et, surtout, des rouges de Lisbonne, de Santarem et de Sétubal. Bientôt, ils prospectèrent les régions septentrionales du Portugal et, tout particulièrement le vignoble de l'arrière-pays de Porto, l'Alto Douro. Ces premiers portos, de même que les autres vins portugais, étaient, alors, des vins ordinaires, très colorés et forts que les Anglais appelèrent des « black wines ». Cette diversification des sources de ravitaillement, cet engouement, notamment en Angleterre, pour les « black wines », ne pouvaient manquer

de concurrencer très sérieusement les clarets gascons, et, ce, au moment où des complications diplomatiques et douanières précipitèrent cette évolution.

Les guerres du siècle de Louis XIV favorisèrent les mesures de rétorsion économique contre les vins français notamment pendant le conflit de la Ligue d'Augsbourg, entre 1688 et 1697, qui vit l'Angleterre décréter la guerre de blocus maritime; celle-ci visait à ruiner le commerce de la France. Ce fut la grande crise de mévente des clarets bordelais dont pâtit gravement l'entreprise hardie des Pontac à Haut-Brion. Les vins ibériques en profitèrent pour renforcer leur position sur le marché britannique. Quand la paix fut revenue, la situation ne s'améliora guère pour les vins de France, tout au contraire, les tarifs douaniers anglais furent alourdis, puisque les clarets durent acquitter à leur entrée en Angleterre, des droits plus de deux fois supérieurs à ceux que payaient leurs rivaux (FISHER, 1700, 1770, 1971). Dans ces conditions les vins bordelais ne pouvaient lutter à armes égales avec leurs concurrents ibériques.

Cette vogue des « black wines » espagnols et portugais tenait beaucoup plus à leur prix modéré qu'à leur qualité supérieure; ils étaient encore des vins communs. Aussi, tout espoir n'était-il pas perdu pour les clarets, à condition de présenter aux consommateurs britanniques fortunés des vins d'un type nouveau. En effet, les classes dirigeantes anglaises, la haute société moyenne (« upper middle class ») enrichies par le négoce, renouvelaient, à l'époque, leur art de vivre, tant dans des intérieurs raffinés que dans la vie sociale où les « coffee-houses » et les clubs prenaient une grande place (PIJASSOU, 1978). Ces gens riches restaient des « claret's lovers », des « amoureux du claret », comme on disait joliment à l'époque. Toutefois, le claret traditionnel supportait mal les lourds droits de douane; il ne correspondait pas non plus aux nouveaux besoins des consommateurs anglais. Plutôt que d'imiter la « façon hollandaise » du mutage, les créateurs des grands crus du Médoc et de Haut-Brion comprirent qu'il fallait présenter aux connaisseurs britanniques un autre type de claret.

Les « New-French Clarets »

Précisément, dans la première décennie du XVIIIe siècle, des vins d'un type nouveau, les « New French Clarets », les « nouveaux clarets français » furent mis en vente sur le marché de Londres. Ce fait capital dans l'histoire des vins bordelais et dans l'avènement de la qualité des grands vins rouges correspondit à une « révolution vinicole ».

Les documents britanniques mettent en lumière cette naissance des grands crus (PIJASSOU, 1978). Plus de cent cinquante « avis » parus dans le journal officiel anglais la « London Gazette », entre 1703 et 1711, montrent que ce nouveau vocable désignait uniquement les grands crus médocains et Haut-Brion. Parmi ces annonces de vente aux enchères publiques, la plus significative parut dans le numéro du 22 mai 1707; on proposait aux amateurs londoniens un important lot de « New French Clarets » provenant, précise le document, des « crus (growths) de Lafite, Margaux et Latour ». Le vocable « growth », c'est-à-dire de cru, était employé, pour la première fois, dans un sens nouveau. Il caractérisait un terroir viticole particulier et non pas une appellation générale, graves, palus, côtes ou, tout simplement, claret. Tout au contraire, le terme « growth » désignait nommément les trois grands crus médocains qui, à la suite de Haut-Brion, avaient acquis la

notoriété, en Angleterre, dans la première décennie du XVIIIe siècle. Autre fait significatif, ces grands vins étaient chers; à l'époque, ils coûtaient trois à quatre fois plus que les clarets ordinaires.

Tout naturellement, les grands crus ornèrent la table des grands seigneurs anglais. Ainsi, John Hervey, Comte de Bristol fut, de 1702 à 1744, un fidèle acheteur des « vins de Haut-Brion, de Lafite, de Latour et de Margaux »; à eux seuls, les « New French Clarets », entrés dans la cave de Lord Hervey, représentèrent 48,8 p. 100 de la valeur totale des vins français qu'il acheta; ils lui revinrent de 2 600 à 3 600 livres tournois le tonneau, soit environ, de 31 000 à 43 000 F actuels. L'un des plus célèbres amateurs de vins fins du Médoc, fut le premier Ministre anglais, Sir Robert Walpole. En 1733, par exemple, il acheta, pour 74 000 F actuels, environ, de grands crus, c'est-à-dire onze barriques qui se répartissaient ainsi : une barrique de Haut-Brion, trois de Lafite, et, surtout, sept de Château Margaux (prix du tonneau : 180 livres sterling, soit 2 160 livres tournois ou près de 26 000 de nos F).

Enfin, l'un des documents anglais le plus expressif, est bien la lettre que le négociant britannique Y. Bruvenal adressa, de Bordeaux, le 16 octobre 1723, à Henry Powell, sommelier du Prince de Galles, le futur George II. Il présentait à son correspondant un tableau de la récolte de 1723 en Médoc : « Je peux vous assurer, écrivait-il, que nos vins en général, cette année, sont extraordinairement bons; ils révèlent un goût excellent et ils sont très corsés... Les quatre crus supérieurs (« topping growths ») de Latour, Lafite, Château Margaux et Pontac (nom habituel de Haut-Brion, en Angleterre, à l'époque), sont excessivement bons ». Le millésime 1723 était d'excellente qualité, notamment pour les plus grands crus, dont le texte montre la prééminence, ce qui laisse supposer l'existence d'une hiérarchie qualitative de la production vinicole. Les quatre grands, disait Bruvenal s'entendaient pour fixer les prix; ils s'en remettaient au Château Margaux qui était alors, « leur étoile polaire » (« Their North Star »). Le négociant anglais trouvait excessives, en matière de prix, les prétentions des propriétaires en raison de l'abondance de la récolte : *J'ai payé, nous dit-il, 2 000 livres* (*tournois*) *pour un tonneau de Haut-Brion de la récolte précédente et Mme d'Aulède* (*copropriétaire de Haut-Brion*) *m'a demandé le même prix cette année, bien qu'elle ait récolté 71 tonneaux alors qu'elle n'en avait eu que 37 l'année dernière.* Aussi, proposait-il à son correspondant les grands vins d'Issan, dont il faisait l'éloge en ces termes : *Jamais de ma vie je n'ai dégusté un Château d'Issan aussi bon que celui de cette année. Ce sont vraiment des vins charmants.* Ce document suggère que, derrière les premiers grands crus, la production médocaine s'était étoffée dès les deux premières décennies du XVIIIe siècle.

La conquête viticole du Médoc et la Fondation des Grands Châteaux

Dans la création des grands crus, le Médoc tint le rôle d'une « région pilote », comme nous dirions aujourd'hui. Vers 1710, la presqu'île médocaine était encore une terre peu peuplée et faiblement viticole. A la différence de la région des Graves, autour de Bordeaux, la vigne n'apparaissait en Médoc que sous forme d'îlots peu étendus, isolés au milieu des landes, des bois et des terres à seigle. De larges espaces, les croupes de graves, étaient à conquérir. Aussi, la création du vignoble des grands crus médocains prit-elle l'allure d'une colonisation agricole. Des années 1685

à 1710, aux « années 60 » (1760-1770) du XVIIIe siècle, la croissance des espaces viticoles médocains fut irrésistible. Cette « onde pionnière », qui se déplaça des rives de la jalle de Saint-Médard, au Sud, à Pauillac et à Saint-Estèphe, au Nord, favorisa la mise en place d'une structure foncière où s'affirme la prédominance de la grande propriété, le plus souvent seigneuriale.

Cette « fureur de planter » fut dirigée par les seigneurs du Parlement de Bordeaux (PIJASSOU, 1968); à l'instar des Pontac à Haut-Brion, ils y créèrent de grandes unités d'exploitation spécialisées dans la viticulture. Ainsi, le Marquis d'Aulède, président du Parlement de Guyenne, seigneur de la Mothe-Margaux, beau-frère de François-Auguste de Pontac, créa le vignoble de Château-Margaux. A Pauillac, la lignée des de Ségur, elle aussi membre de l'aristocratie parlementaire, possédait les seigneuries de Lafite et de Latour qu'elle planta en vignes (PIJASSOU, 1978). Ces « princes des vignes », selon la formule rapportée par l'abbé BAUREIN (1876) eurent de nombreux « imitateurs », eux aussi d'origine urbaine. Ce fut la ville de Bordeaux qui domina, par ses investissements, la production viticole dont elle assurait la commercialisation. On peut vraiment parler de la symbiose d'un noyau urbain et d'un milieu rural, tant était grande, à cette époque, la main-mise de la ville sur le plat pays rural.

Quelle que soit la région considérée en Haut-Médoc, les châteaux viticoles, souvent sièges de seigneuries, dominaient, vers 1760, l'espace rural aménagé. Les grands plantiers de leurs vignobles, bien regroupés autour des bâtiments d'exploitation, traduisaient les réussites exemplaires de cette colonisation viticole médocaine qui avait été menée à bien en moins de trois quarts de siècle par l'aristocratie parlementaire de Bordeaux, fondatrice des grands crus. Toutefois, cette main-mise, réalisée sur les meilleurs terroirs par les grandes familles urbaines, n'avait pas totalement chassé les petits paysans tenanciers et modestes propriétaires vignerons. Bien qu'il soit difficile d'évaluer la part qu'ils détenaient du vignoble médocain, il est hors de doute qu'elle était réduite, le plus souvent inférieure à 20 p. 100. Le grand morcellement et la petitesse des parcelles paysannes, le plus fréquemment reléguées dans les parties les moins bonnes du finage paroissial, autour des hameaux et des villages, contrastaient singulièrement avec la masse et l'ordonnance du vignoble aristocratique.

La création des nouvelles techniques viticoles

Nantis de puissants moyens financiers, les responsables des plus grands châteaux médocains, de concert avec les nouveaux négociants installés aux Chartrons, prirent, lentement à vrai dire, des initiatives bénéfiques en matière d'encépagement, de vinification et de conservation des vins qui aboutirent peu à peu à la mise au point des grands vins.

Un document, qui remonte aux années 1720, décrit l'art de « faire les vins de Château Margaux suivant la maxime de Berlon » (maître de chai au Château Margaux, dans la première décennie du XVIIIe siècle). Il montre qu'au début du XVIIIe siècle, les pratiques de vinification étaient encore bien sommaires dans la plupart des propriétés médocaines. Pour dépasser cette tradition et aboutir au grand vin, il fallut la volonté éclairée, mais, aussi les moyens financiers d'un ou de plusieurs responsables des grands domaines. Berlon, sans doute conseillé par le Marquis d'Aulède, fut l'un de ces pionniers. Comme le vignoble de Margaux

notoriété, en Angleterre, dans la première décennie du XVIIIe siècle. Autre fait significatif, ces grands vins étaient chers; à l'époque, ils coûtaient trois à quatre fois plus que les clarets ordinaires.

Tout naturellement, les grands crus ornèrent la table des grands seigneurs anglais. Ainsi, John Hervey, Comte de Bristol fut, de 1702 à 1744, un fidèle acheteur des « vins de Haut-Brion, de Lafite, de Latour et de Margaux »; à eux seuls, les « New French Clarets », entrés dans la cave de Lord Hervey, représentèrent 48,8 p. 100 de la valeur totale des vins français qu'il acheta; ils lui revinrent de 2 600 à 3 600 livres tournois le tonneau, soit environ, de 31 000 à 43 000 F actuels. L'un des plus célèbres amateurs de vins fins du Médoc, fut le premier Ministre anglais, Sir Robert Walpole. En 1733, par exemple, il acheta, pour 74 000 F actuels, environ, de grands crus, c'est-à-dire onze barriques qui se répartissaient ainsi : une barrique de Haut-Brion, trois de Lafite, et, surtout, sept de Château Margaux (prix du tonneau : 180 livres sterling, soit 2 160 livres tournois ou près de 26 000 de nos F).

Enfin, l'un des documents anglais le plus expressif, est bien la lettre que le négociant britannique Y. Bruvenal adressa, de Bordeaux, le 16 octobre 1723, à Henry Powell, sommelier du Prince de Galles, le futur George II. Il présentait à son correspondant un tableau de la récolte de 1723 en Médoc : « Je peux vous assurer, écrivait-il, que nos vins en général, cette année, sont extraordinairement bons; ils révèlent un goût excellent et ils sont très corsés... Les quatre crus supérieurs (« topping growths ») de Latour, Lafite, Château Margaux et Pontac (nom habituel de Haut-Brion, en Angleterre, à l'époque), sont excessivement bons ». Le millésime 1723 était d'excellente qualité, notamment pour les plus grands crus, dont le texte montre la prééminence, ce qui laisse supposer l'existence d'une hiérarchie qualitative de la production vinicole. Les quatre grands, disait Bruvenal s'entendaient pour fixer les prix; ils s'en remettaient au Château Margaux qui était alors, « leur étoile polaire » (« Their North Star »). Le négociant anglais trouvait excessives, en matière de prix, les prétentions des propriétaires en raison de l'abondance de la récolte : *J'ai payé, nous dit-il, 2 000 livres* (*tournois*) *pour un tonneau de Haut-Brion de la récolte précédente et Mme d'Aulède* (*copropriétaire de Haut-Brion*) *m'a demandé le même prix cette année, bien qu'elle ait récolté 71 tonneaux alors qu'elle n'en avait eu que 37 l'année dernière.* Aussi, proposait-il à son correspondant les grands vins d'Issan, dont il faisait l'éloge en ces termes : *Jamais de ma vie je n'ai dégusté un Château d'Issan aussi bon que celui de cette année. Ce sont vraiment des vins charmants.* Ce document suggère que, derrière les premiers grands crus, la production médocaine s'était étoffée dès les deux premières décennies du XVIIIe siècle.

La conquête viticole du Médoc et la Fondation des Grands Châteaux

Dans la création des grands crus, le Médoc tint le rôle d'une « région pilote », comme nous dirions aujourd'hui. Vers 1710, la presqu'île médocaine était encore une terre peu peuplée et faiblement viticole. A la différence de la région des Graves, autour de Bordeaux, la vigne n'apparaissait en Médoc que sous forme d'îlots peu étendus, isolés au milieu des landes, des bois et des terres à seigle. De larges espaces, les croupes de graves, étaient à conquérir. Aussi, la création du vignoble des grands crus médocains prit-elle l'allure d'une colonisation agricole. Des années 1685

à 1710, aux « années 60 » (1760-1770) du XVIIIe siècle, la croissance des espaces viticoles médocains fut irrésistible. Cette « onde pionnière », qui se déplaça des rives de la jalle de Saint-Médard, au Sud, à Pauillac et à Saint-Estèphe, au Nord, favorisa la mise en place d'une structure foncière où s'affirme la prédominance de la grande propriété, le plus souvent seigneuriale.

Cette « fureur de planter » fut dirigée par les seigneurs du Parlement de Bordeaux (PIJASSOU, 1968); à l'instar des Pontac à Haut-Brion, ils y créèrent de grandes unités d'exploitation spécialisées dans la viticulture. Ainsi, le Marquis d'Aulède, président du Parlement de Guyenne, seigneur de la Mothe-Margaux, beau-frère de François-Auguste de Pontac, créa le vignoble de Château-Margaux. A Pauillac, la lignée des de Ségur, elle aussi membre de l'aristocratie parlementaire, possédait les seigneuries de Lafite et de Latour qu'elle planta en vignes (PIJASSOU, 1978). Ces « princes des vignes », selon la formule rapportée par l'abbé BAUREIN (1876) eurent de nombreux « imitateurs », eux aussi d'origine urbaine. Ce fut la ville de Bordeaux qui domina, par ses investissements, la production viticole dont elle assurait la commercialisation. On peut vraiment parler de la symbiose d'un noyau urbain et d'un milieu rural, tant était grande, à cette époque, la main-mise de la ville sur le plat pays rural.

Quelle que soit la région considérée en Haut-Médoc, les châteaux viticoles, souvent sièges de seigneuries, dominaient, vers 1760, l'espace rural aménagé. Les grands plantiers de leurs vignobles, bien regroupés autour des bâtiments d'exploitation, traduisaient les réussites exemplaires de cette colonisation viticole médocaine qui avait été menée à bien en moins de trois quarts de siècle par l'aristocratie parlementaire de Bordeaux, fondatrice des grands crus. Toutefois, cette main-mise, réalisée sur les meilleurs terroirs par les grandes familles urbaines, n'avait pas totalement chassé les petits paysans tenanciers et modestes propriétaires vignerons. Bien qu'il soit difficile d'évaluer la part qu'ils détenaient du vignoble médocain, il est hors de doute qu'elle était réduite, le plus souvent inférieure à 20 p. 100. Le grand morcellement et la petitesse des parcelles paysannes, le plus fréquemment reléguées dans les parties les moins bonnes du finage paroissial, autour des hameaux et des villages, contrastaient singulièrement avec la masse et l'ordonnance du vignoble aristocratique.

La création des nouvelles techniques viticoles

Nantis de puissants moyens financiers, les responsables des plus grands châteaux médocains, de concert avec les nouveaux négociants installés aux Chartrons, prirent, lentement à vrai dire, des initiatives bénéfiques en matière d'encépagement, de vinification et de conservation des vins qui aboutirent peu à peu à la mise au point des grands vins.

Un document, qui remonte aux années 1720, décrit l'art de « faire les vins de Château Margaux suivant la maxime de Berlon » (maître de chai au Château Margaux, dans la première décennie du XVIIIe siècle). Il montre qu'au début du XVIIIe siècle, les pratiques de vinification étaient encore bien sommaires dans la plupart des propriétés médocaines. Pour dépasser cette tradition et aboutir au grand vin, il fallut la volonté éclairée, mais, aussi les moyens financiers d'un ou de plusieurs responsables des grands domaines. Berlon, sans doute conseillé par le Marquis d'Aulède, fut l'un de ces pionniers. Comme le vignoble de Margaux

comprenait à la fois des vignes blanches et des vignes rouges, il prit l'initiative de faire cuver à part, la vendange rouge préalablement triée et peu égrappée, et la vendange blanche. Néanmoins, il ajoutait à chaque cuve de rouge quelques barriques de vin blanc (ce qui confirme que le claret proviendrait bien du mélange de vin rouge et de vin blanc). Il apporta un soin extrême à toutes les opérations de vinification; de plus, il eut le souci constant de sélectionner chaque récolte. Ce choix, d'autant plus nécessaire que la production était diverse, était à la base même de la notion de grand vin, bien distincte de celle de second vin. Ces deux qualités différentes de vins rouges de Château Margaux étaient mises en relation, dès cette époque avec une certaine hiérarchie des terroirs; on est mal renseigné sur les cépages; on a l'impression d'une assez grande diversité; le sauvignon était le seul nommément désigné. La pratique de l'ouillage était courante; Berlon mettait à part une partie de la récolte pour cet usage; sans doute connaissait-il les « tirages au fin ». Il veillait à n'utiliser que des futailles bien propres, préalablement rincées au vin blanc. Il n'avait pas encore distingué le rôle des vieilles vignes dans la production des vins de la plus haute qualité.

La distinction entre grands vins et seconds vins alla en s'affirmant dans les grands crus médocains au cours du XVIIIe siècle. S'agissant des origines de la production des grands vins, on ne saurait accorder trop d'attention à cet aspect de la nouvelle politique viticole du Médoc, d'autant plus que son adoption exigeait de sérieux sacrifices financiers de la part des propriétaires. Le « second vin » était vendu de deux à cinq fois moins cher que le grand vin. Or c'est seulement en Médoc que cette pratique s'est imposée, et seulement, dans les vignobles des grands domaines qui vont s'élever à la dignité de grands crus. Dans ces derniers, on avait rapidement compris que la qualité ne pouvait s'associer à la quantité; aussi, limita-t-on les rendements.

On prit l'habitude de loger les grands vins et les seconds dans des barriques neuves en merrain de chêne de première qualité. Nous savons que, dès 1740-1741 pour le moins, ces merrains provenaient des ports de la Baltique. A partir de 1760, on utilisa des merrains de Stettin, de Riga, de Lübeck. On mit au point dans la première moitié du XVIIIe siècle, la pratique systématique des « tirages au fin », c'est-à-dire des soutirages répétés. C'était ainsi, s'engager sur la bonne voie, celle de la conservation des grands vins. En même temps, on découvrit les mérites du « collage », ou « fouettage » avec des blancs d'œufs préalablement battus en neige et mélangés avec le vin à l'aide du « fouet » (PIJASSOU, 1978). Cependant, l'une des découvertes techniques la plus importante dans l'art de la conservation des vins, nous est révélée par un document daté des Chartrons (Arch. privées de la Maison Johnston). Parmi elles, nous relevons la première mention connue de l'emploi de l'anhydride sulfureux, dégagé à partir de la combustion d'une mèche soufrée, à la fois pour aseptiser les fûts, et, surtout, pour assurer la longue garde des grands vins : « Quand on soutire les vins, nous dit-on, il est bon de faire brûler le quart ou le sixième d'une allumette hollandaise par barrique de claret et plus pour le vin blanc, car il (le gaz sulfureux) contribue à conserver les vins en parfait état de fraîcheur ».

Ce texte appelle deux commentaires. D'une part, dès 1765 — et, très certainement, quelques décennies auparavant, car il n'est pas fait état d'une nouveauté — on avait pris conscience du rôle de l'anhydride sulfureux comme facteur important de la conservation des vins; si ces derniers gardaient ainsi leur fraîcheur (« freshness »), c'est qu'ils pourraient vieillir sans risque d'altération. L'œnologie contemporaine s'est chargée d'expliquer scientifiquement ce que les hommes du XVIIIe siècle avaient constaté empiriquement (PEYNAUD, 1971). D'autre part, l'expression

« Dutch match », pour mèche soufrée, dite « allumette de chai », suggère l'origine hollandaise de la technique du soufre. Sans doute, découvrit-on en Hollande l'intérêt du gaz sulfureux pour conserver les vins liquoreux, dont les Néerlandais étaient grands amateurs, vins dont on sait la fragilité. Depuis la Hollande, la mèche soufrée se répandit, comme pratique vinicole, en Europe occidentale et, tout particulièrement, à Bordeaux.

La naissance d'une hiérarchie viticole

Ainsi, dans la deuxième moitié du XVIIIe siècle, le négoce des Chartrons, sans doute beaucoup plus que les châteaux médocains, était parvenu à maîtriser convenablement le vieillissement des grands vins. Cette réussite, en facilitant la comparaison des millésimes successifs, devait conduire à hiérarchiser la production viticole du Médoc. Déjà, on l'a noté, les textes extraits de la « London Gazette », la lettre de Bruvenal, sous-entendaient l'existence d'une hiérarchie qualitative en plaçant au premier plan les quatre « meilleurs crus »; ces derniers étaient suivis de nombre d'autres, dont on ne connaissait, alors, que quelques-uns d'entre eux.

Les choses se précisèrent par la suite. C'est bien ce que montrent les documents exceptionnels conservés par le bureau de courtage bordelais Tastet et Lawton. Les deux premiers registres couvrent la période qui va de 1742 à 1775, c'est-à-dire pour 34 récoltes consécutives. Abraham Lawton, négocia 56 757 tonneaux, autrement dit 510 813 hl, pour un prix global égal à 19 392 806 livres tournois, c'est-à-dire à plus de 200 millions de francs actuels. Il s'intéressa avant tout à la production médocaine, mais également aux vins de Graves et des palus, ce qui facilite les comparaisons. Comme les prix de chaque cru acheté sont indiqués, il est possible d'établir en toute objectivité, les premiers linéaments d'un classement des grands crus médocains.

Le prix moyen annuel du tonneau de vin par région productrice fait apparaître clairement que le Médoc est au premier rang des cotations. Une hiérarchie s'établit, également, entre les productions des grandes paroisses viticoles médocaines. Les vins de la paroisse de Margaux se détachaient, alors, largement en tête; ils étaient les grands vins les plus chers du Médoc et, par conséquent, de l'ensemble des vins bordelais; ceux des paroisses voisines, Cantenac, Labarde, Soussans et Arsac, suivaient en léger retrait. Ainsi, la future « appellation » Margaux, se situait en tête. Venaient ensuite, par ordre décroissant des cotations, les vins de Pauillac, de Saint-Julien de Beychevelle, puis ceux de Saint-Estèphe. Cette prééminence des grands vins de Margaux à l'époque, n'a rien de surprenant; si la promotion qualitative, partie comme on l'a vu de Haut-Brion, a gagné le Médoc, il est normal que le premier terroir de haute qualité, que l'on rencontre en venant de Bordeaux, celui de Margaux, ait été le premier à révéler ses aptitudes. En revanche, à Saint-Julien et Pauillac, Lafite et Latour exceptés, cette promotion ne s'est manifestée qu'avec quelque retard. On ne saurait avoir de démonstration plus claire des modalités de cet avènement de la qualité des grands vins, dont le Médoc du XVIIIe siècle nous fournit le modèle, que cette prééminence s'affirmant de proche en proche, et du Sud au Nord, Margaux prenant le départ. On mesure d'ailleurs mieux encore la portée du phénomène si l'on songe que pour Pomerol et pour le secteur des « graves » de Saint-Émilion, à Figeac notamment, le « décollage », comme on dit aujourd'hui, ne se produisit, sur des terroirs assez semblables à ceux de Margaux, qu'un siècle plus tard.

L'étalement des cotations équivaut à un classement des vins médocains par aire productrice. Il nous fait pressentir une hiérarchie des crus individuellement désignés que le dépouillement complet des deux premiers registres d'Abraham Lawton met en pleine lumière. En tête se détachent, ce qui n'est pas une surprise, les 4 premiers grands crus dont la cotation moyenne dépassa 1 200 livres, soit plus de 14 000 F actuels. Ensuite, un palier des prix moyens se dessine, entre 800 livres et 600 livres le tonneau. On y relève 13 noms, qui étaient déjà des seconds crus. On discerne, ensuite, un autre palier de cotation qu'on pourrait considérer comme celui des troisièmes crus; il comprenait les 15 propriétés dont le prix moyen du tonneau se situait entre 540 livres et 365 livres. Enfin, 5 autres crus, cotés 4 fois moins cher que les premiers fermaient la marche.

Conclusion

L'intérêt de cette analyse est de faire apparaître pour une période ancienne et bien délimitée, de 1742 à 1775, l'existence d'une hiérarchie des prix du tonneau de grand vin en Médoc et, par conséquent, la naissance d'un classement officieux. Il est, aussi, de montrer que deux séries de phénomènes sont liées, comme de nos jours : l'un relève de la géographie physique; il concerne les terroirs : tous les grands crus de 1742-1775, même ceux qui ont rétrogradé par la suite, sont situés sur de très belles croupes de graves, les premiers occupant les meilleures. L'autre, est humain, et il s'agit des grands domaines qui sont parvenus, dès cette époque, à un regroupement systématique des parcelles par quoi se trouve constituée une unité d'exploitation bien assise et bien située, sur laquelle la politique promotionnelle peut être menée à moyen et à long terme. C'était là un fait sans précédent dans les annales de la viticulture bordelaise. Il entre de lui-même dans le cadre de ce changement que nous avons qualifié de « révolution viticole ».

Cette genèse des grands crus fut progressive, même si elle fut menée par des gens fortunés, au premier rang desquels se plaça l'aristocratie parlementaire de Bordeaux. Ils ne lésinèrent pas sur les investissements, accaparèrent les meilleurs terroirs, constituèrent de grands domaines à l'assiette foncière bien regroupée. S'ils n'éliminèrent pas complètement la petite propriété paysanne, ils marquèrent de leur empreinte une structure agraire fortement hiérarchisée et dominée par la grande propriété. Le « chateau viticole », originalité médocaine, naquit indiscutablement, avec ses caractéristiques modernes, dans 75 premières années du XVIIIe siècle.

Summary

Historical and geographical conditions of the rise of the " Grands Crus " in the eighteenth Century

Although the origins of the Bordelais vineyards date back many years ago, the improvement of the quality of these wines dates only to the eighteenth century. The claret of the middle ages was made essentially in the Graves region close to the town and was a good wine for everyday consumption: " pure, clean, young and saleable "; it was exported in bulk to England. The technique of ageing wine was then still unknown. During the second half of the seventeenth century competition arose in the form of many exotic drinks, for example the Iberian wines and

also the " black wines " which were sold in western Europe by the Dutch. The market conditions for the Bordeaux wines thus changed and in addition the English market became less accessible for the traditional clarets with the imposition of heavy import taxes. To comply with the new tastes of the ruling English classes, first the Pontac family at Haut-Brion and following them, the parliamentary aristocracy of Bordeaux created a new type of wine: the " New French Clarets ", the " Grands crus ". Wines were planted to almost cover the pilot region, the Medoc, between 1685 and 1760. This viticultural colonisation occured within the famework of large land holdings. The winemaking chateaux secured the best terrains with the gravel sands, leaving less land available for the peasants'small plots. In conjuction with the new negociants of the " Chartrons " (a district of Bordeaux) new techniques of wine production grew slowly in the Medoc: grape yield reduction, selective harvesting, improvement of the wine varieties, topping up of casks, racking, use of sulphur wicks. These techniques favorised the establishment of the Grands Crus. This " viticultural revolution ", the introduction of quality, the work of the " princes des vignes " rested on the hierarchy of terrain and the " crus " which it produces. It took place during the first seventy-five years of the eighteenth century.

Key-words: *Bordelais — vineyards — qualitative promotion — historic — geography.*

Références bibliographiques

Archives départementales de la Gironde, H. 735, f° 13.

Archives privées de la Maison Johnston N., Manuscrit 1765, " Directions about wines copied from a note of my grand father ".

BAUREIN J., 1876. Variétés bordelaises, 4 vol., Tome I, p. 296.

DION R., 1959 Histoire de la vigne et du vin en France, Paris, p. 118-126.

ENJALBERT H., 1975. Histoire de la vigne et du vin, l'avènement de la qualité, p. 20-21.

ÉTIENNE R., 1962. Bordeaux Antique. Histoire de Bordeaux, Fédération historique du Sud-Ouest Ed., Tome I, p. 102-108.

FISHER H. E. S., 1700, 1770, 1971. The Portugal trade A. study of Anglo-Portuguese Commerce, Londres, p. 27.

LOCKE J., 1766. Œuvres complètes, 10 volumes, Londres, Tome X, p. 329.

PEYNAUD E., 1971. Connaissance et travail du vin, Ch. XXII.

PIJASSOU R., 1968. La naissance des grands vins. Bordeaux au XVIIIe siècle. Histoire de Bordeaux, Fédération Historique du Sud-Ouest Ed., Tome V, p. 155-190.

PIJASSOU R., 1978. Un grand vignoble de qualité, le Médoc. Thèse Doctorat État, Université Bordeaux III.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 15-26.

Évolution des variétés cultivées pour la production de vin en Californie

H.-P. OLMO

University of California,
Davis (California) U.S.A.

Résumé

Les zones géographiques et les zones de température des régions viticoles de Californie sont étudiées. Les connaissances actuellement admises doivent être modifiées.

L'état et la maturité des raisins au moment de la vendange sont exceptionnellement bons en raison de l'absence relative de maladies et d'insectes due à un été sec et presque sans pluie.

Le principal facteur d'amélioration de la qualité du vin depuis les premiers vins produits en 1784 a été le changement des variétés cultivées. Dès 1880, le « Mission » introduit par les explorateurs espagnols fut prédominant et donna des vins médiocres. Le « Zinfandel » supposé d'origine hongroise devint la variété principale jusqu'à ce qu'il soit détrôné par le Carignan au début des années 1960. Depuis 1900, le Sultania (Thompson Seedless) représentait la moitié de la vendange mais a été remplacé progressivement par le Colombard et le Chenin Blanc.

Le changement le plus spectaculaire dans le choix des variétés apparut lors de l'expansion 1970/74. Un tableau dresse la liste actuelle des variétés cultivées pour l'élaboration des vins.

De nouvelles variétés produites spécialement pour les régions chaudes ont pris de l'importance, occupant maintenant 12,5 p. 100 de la superficie. Les plus récentes introductions de variétés pour le vin rouge sont « Carnelian », « Centurion » et « Carmine ». Elles sont brevetées par l'Université de Californie.

Mots clés : *Vins de Californie et variétés cultivées. Vins de Californie — variétés cultivées — évolution.*

Introduction

On a dit avec raison que le rôle principal de l'œnologue est de sauvegarder les bonnes qualités intrinsèques de la vendange; le vignoble est déjà prédestiné à assurer ce rôle. Les vins classiques de qualité supérieure ont été élaborés par tâtonnements au cours des siècles; alors que les performances des cépages cultivées ont été étudiées sur des surfaces plus réduites.

Le vaste champ d'expérience européen a servi de base au développement

des industries du vin dans le Nouveau Monde. Le processus d'adaptation des cépages et les recherches pour obtenir des vins de meilleure qualité se sont conformés à un modèle établi. Les cépages apportés du pays d'origine par les immigrants étaient transplantés dans les endroits que l'on estimait les plus semblables à leur habitat ancestral. Ainsi, les viticulteurs français venant de Sauternes pensèrent que les graviers de la vallée de Livermore à l'est de San Francisco équivalaient à ceux de Sauternes; ils plantèrent les premiers vignobles de Sémillon et Sauvignon blanc. Dans cette région à été chaud et sec, la pourriture noble ne s'est pas développée; par contre on y a produit un certain nombre de vins doux naturels. Au nord de San Francisco le relief de collines et les forêts attirèrent les Italiens provenant du Piémont et de Chianti. Ils apportèrent plusieurs de leurs propres cépages. Ce processus dure encore et aujourd'hui on accueille les nouveaux vignobles et les chais de Moët et Chandon dans Napa Valley.

Les régions vinicoles

En 1976 le vignoble de Californie atteignait une superficie de 583 400 acres (236 040 ha) dont 277 600 acres (112 320 ha) consacrés aux raisins de cuve. Le rendement moyen était de 4,72 t/acre (11,86 t/ha) contre 5,71 t/acre (14,35 t/ha) en 1975. La production des raisins de cuve, de 1,3 millions de t en 1976, était à peu près la même en 1975. La Californie produit environ 90 p. 100 de la production totale aux États-Unis.

En arrière-plan à cette discussion examinons brièvement quelques-uns des traits caractéristiques de la viticulture en Californie. Les recherches dans le but d'obtenir la qualité optimale du vin pour un cépage donné étaient faites par tâtonnements, en utilisant toujours les mêmes cépages; on notait les résultats obtenus dans des régions différentes. On a donc étudié les interactions entre cépages et environnement. Hilgard et Bioletti ont classé les cépages premièrement selon un type général de vin à la manière européenne et deuxièmement selon des types de vins différents provenant des différentes régions géographiques de Californie (Amerine et Winkler, 1944).

Les régions viticoles de Californie peuvent être classées selon des données géographiques variées dont les facteurs les plus importants sont la topographie, le plus ou moins grand éloignement des eaux froides de l'Océan Pacifique et la répartition de la pluie (fig. 1). Les chaînes côtières s'allongent parallèlement à la côte du Pacifique; l'altitude des régions viticoles est moyenne, ne dépassant pas 600 ft (180 m) dans la plupart des cas. Les vallées les plus larges, s'allongent également parallèlement au littoral avec une tendance à l'orientation nord-ouest sud-est, et sont soumises aux influences marines pendant l'été. Plusieurs vallées plus petites sont juxtaposées selon diverses orientations et offrent un ensemble complexe d'expositions et d'altitudes.

La région côtière se divise en trois parties : la Côte Nord située au nord de la baie de San Francisco; la Côte Centrale qui s'étend jusqu'à la chaîne de montagnes bordant la Californie du Sud et la Côte qui s'étend jusqu'à la frontière mexicaine.

Les raisins de cuve sont cultivés exclusivement dans le vignoble de la côte, tandis que la vallée centrale produit surtout des raisins secs et des raisins de table.

Les vignobles les plus célèbres des vallées de Napa et de Sonoma se trouvent

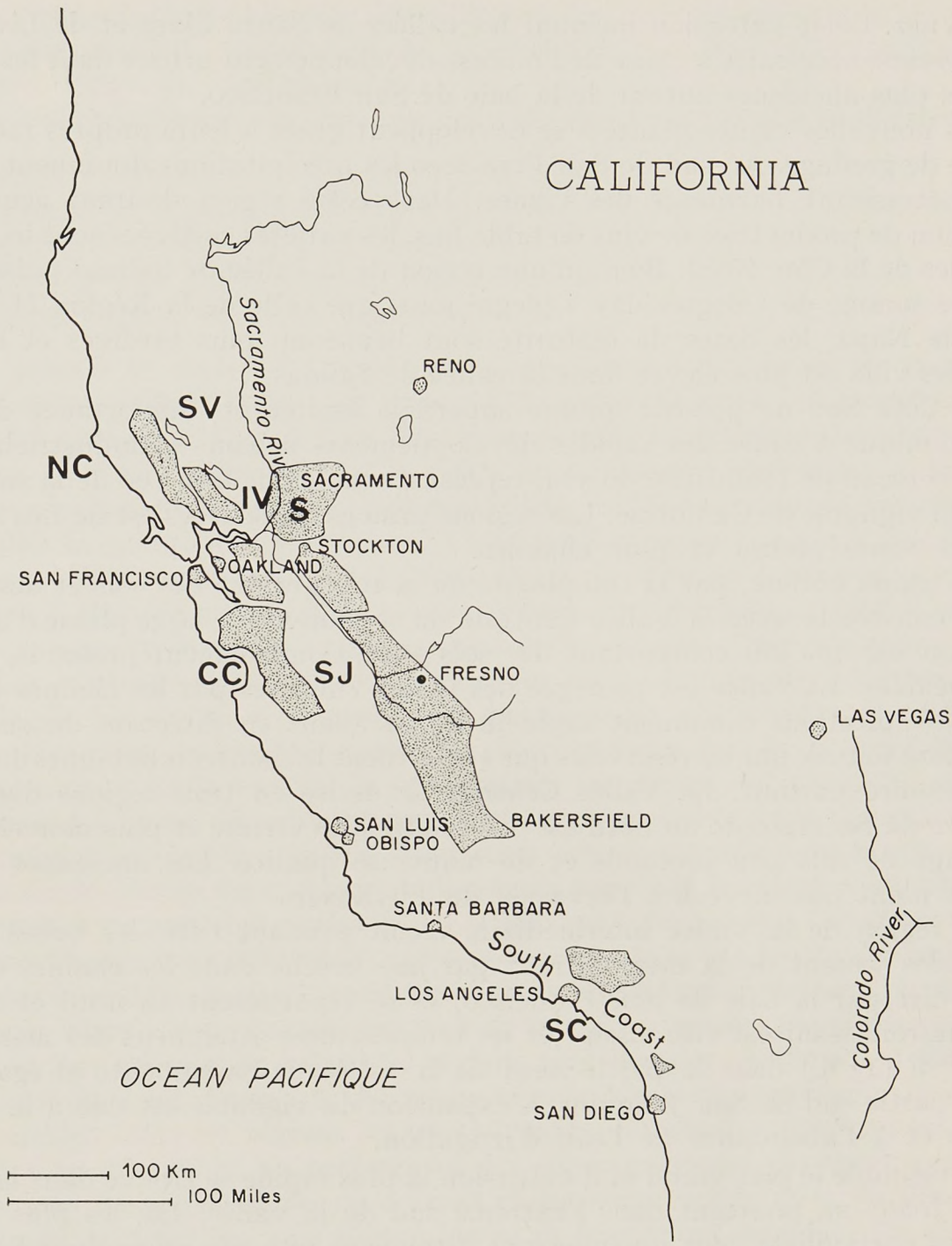


FIG. 1. — *Carte de Californie. Situation des vignobles.*

Région Côtière	NC = la Côte Nord CC = la Côte Centrale SC = la Côte Sud
Vallée Centrale	SV = Vallée de Sacramento IV = Vallée Intermédiaire SJ = Vallée de San Joaquim
Contreforts de Sierra = S	

sur la Côte Nord où environ 17 p. 100 de la surface totale sont consacrés aux raisins de cuve. C'est la seule région ayant des précipitations suffisantes, 30 à 40 pouces (750 à 1 000 mm); ainsi l'irrigation est rarement nécessaire et rarement employée après la première saison suivant la plantation.

Depuis 1970 la région la plus récemment développée pour la production des vins de table est celle de la Côte Centrale : vallées de Salinas, de Santa Maria et de

Santa Ynez. Cette extension incluant les vallées de Santa Clara et de Livermore était devenue nécessaire à cause de l'intense développement urbain dans les régions viticoles plus anciennes autour de la baie de San Francisco.

Les nouvelles vignes plantées se développent grâce à leurs propres racines en absence de greffage. Au sud de San Francisco les précipitations diminuent rapidement, nécessitant l'arrosage des vignes. Dans cette région désirant acquérir la réputation de productrice de vins de table fins, les variétés cultivées sont les mêmes que celles de la Côte Nord. Bien qu'une région de la vallée de Salinas puisse avoir la même somme de « degree-day » (degré-jour) que celle de la Région II dans la vallée de Napa, les dates de maturité sont beaucoup plus tardives et l'acidité totale des vins est plus élevée dans la vallée de Salinas.

La Côte Sud ne possède qu'une superficie limitée et l'importance de cette région diminue à cause des rapides développements urbains et industriels. Cette région, berceau de l'industrie du vin, représente moins de 6 p. 100 de la superficie totale du vignoble de Californie. Les régions principales sont à l'est de Los Angeles dans les zones sèches et plus chaudes.

La région côtière, par la complexité de la topographie des sols et des microclimats constraste avec la Vallée Centrale où se trouve une large plaine d'alluvion de 65 km sur 400 km comportant des sols exceptionnellement profonds, fertiles et perméables. La vallée est protégée des pluies violentes par les chaînes côtières et les précipitations diminuent rapidement en allant en direction du sud; l'eau d'irrigation fournie par les réservoirs que constituent les hautes montagnes des Sierra est nécessaire partout. La Vallée Centrale se divise en trois régions distinctes. La vallée du Sacramento au nord est une plaine plus étroite et plus morcelée avec davantage de sols peu profonds et de mauvaise qualité. Les anciennes régions viticoles n'ont pas survécu à l'invasion du Phylloxera.

La région de la Vallée intermédiaire reçoit pendant l'été des brises froides et humides venant de la mer, entrant par une brèche dans les chaînes côtières (c'est-à-dire par la baie de San Francisco) et se répartissant au nord et au sud. L'effet refroidissant est vite dissipé et les températures atteignent des maximums de 110 ° F (43 °C) dans la partie nord de la vallée de Sacramento et également dans la partie sud de San Joaquim. L'expansion du vignoble est due à la qualité des sols et à l'abondance de l'eau d'irrigation.

Le vignoble le plus grand et d'extension la plus rapide se trouve dans la Vallée de San Joaquim, pourtant dans l'extrême sud de la vallée. Là, les plus grands vignobles particuliers dont quelques-uns atteignent une superficie de 2 à 6 mille acres (800 à 2 400 ha), commencent à produire. En excluant les cépages destinés à produire des raisins secs et des raisins de table, la vallée de San Joaquim comporte presque la moitié de la superficie totale de l'État pour la production des raisins de cuve. Bien que jusqu'à présent on ait produit surtout des vins de mélange ou des vins de table ordinaires et des vins de dessert, plusieurs des plus grands chais mettent actuellement en bouteille des vins issus d'un seul cépage, tels que le Barbera, le Ruby Cabernet, le Colombard et le Chenin blanc. C'est dans cette région où l'on trouve les zones les plus chaudes, où la vigne est irriguée abondamment et pousse d'une manière très vigoureuse, où les vendanges sont avancées, que l'on obtient le meilleur rendement, souvent deux fois celui de la région centrale.

Amérine et Winkler durent changer la classification géographique basée sur la vénérable règle « degree-day » (degré-jour) puisque la température était devenue le principal facteur conditionnant la composition de raisins de cuve (Amérine et Winkler, 1963).

Des enregistrements de température sur de longues périodes dans plusieurs

localités furent faits. L'influence des différences de sol fut négligée et les facteurs tels que l'exposition, l'insolation, la précipitation et l'humidité ne furent pas considérés dans la classification.

Les localités furent réparties en cinq régions de température différente :

Région I moins de 2 500 degree-days F.
Région II de 2 501 à 3 000 degree-days F.
Région III de 3 001 à 3 500 degree-days F.
Région IV de 3 501 à 4 000 degree-days F.
Région V plus de 4 000 degree-days F.

La période de croissance active était considérée du 1er avril au 31 octobre. Dans la même vallée côtière, par exemple la vallée de Napa, on peut trouver la Région I à côté de la baie de San Francisco et aller en direction du nord jusqu'à la Région IV à l'extrême nord de la vallée en parcourant seulement 40 km.

Plus récemment nous avons commencé des expériences dans le but de mettre en parallèle la qualité des vins issus de Cabernet Sauvignon dans la vallée de Napa et les zones de température. Nous avons choisi 11 stations à environ 3 km l'une de l'autre, à altitude et expositions équivalentes. Les résultats en 1976 n'ont montré aucun rapport entre les analyses sensorielles du vin et les sommes « degree-day ». Les vendanges ont été faites quand les raisins eurent atteint à peu près le même degré. Les mesures de croissance des rameaux ont montré des différences significatives entre les localités ayant des réserves d'eau dans le sol très différentes. Dans un endroit de la localité la plus chaude les raisins ne mûrirent même pas suffisamment à cause d'une croissance tardive et excessive de la vigne, alimentée abondamment en eau du sous-sol. Ainsi dans l'étude actuelle nous tenons compte à la fois du développement relatif de la végétation dont un facteur important est l'alimentation en eau souterraine et de la maturité des raisins. Les études sur les variétés cultivées dans différentes zones de température ont fourni des indications utiles pour l'industrie mais elles arrivèrent parfois trop tard. Aussi on a recommandé le « Chenin blanc » pour l'obtention du vin ordinaire dans les régions les plus fraîches et on l'a « déconseillé » dans les régions plus chaudes (Amérine et Winkler, 1963) alors qu'il est devenu le deuxième cépage blanc en importance et qu'il est planté surtout dans les régions les plus chaudes. La grande difficulté est que les tendances du marché et les préférences des consommateurs changent aussi. Pendant les deux dernières années on a vu un changement rapide de la consommation; à l'heure du cocktail les vins blancs légers et fruités ont remplacé les spitirueux plus chers. Ce changement n'était pas prévu parce que le marché des vins rouges avait toujours été plus important que celui des vins blancs. Actuellement il existe une grande demande pour les vins blancs légers. Le Zinfandel, un cépage d'importance vénérable était délaissé à cause de ses mauvaises caractéristiques culturales; mais le vin issu de ce cépage est toujours populaire et aujourd'hui il est l'un des vins les plus recherchés.

État des raisins

L'incidence des maladies et des dégâts causés par les insectes sont deux facteurs dont dépend directement et indirectement la qualité de vin : directement quand les raisins sont atteints et indirectement quand les produits chimiques appliqués aux vignes se retrouvent dans la vendange.

En Californie, il n'y a ni maladies graves, ni insectes à cause de la longue période d'été, pratiquement sans pluie. Les maladies cryptogamiques telles que le mildiou, l'anthracnose et le black-rot se développant sur une vigne humide sont inconnues. Le Phylloxéra gallicole est si rare qu'il n'a jamais été un facteur de propagation.

Les sols étant habituellement profonds, fertiles et bien drainés, le développement du système des racines est extensif. Le développement du Phylloxéra et des dégâts qu'il provoque sont lents. Les vignes se trouvant dans environ 98 p. 100 du vignoble de la côte nord sont résistantes au Phylloxéra; et le cépage le plus recommandé est le Ganzin 1 (Aramon × *rupestris*) considéré comme insuffisamment résistant en Europe.

Seulement quelques insecticides et fongicides doivent être appliqués aux vignes. Les traitements les plus souvent employés sont des applications de soufre pulvérulent (3 à 5 fois) contre l'*Oidium*. Le *Botrytis* a un effet destructif si la pluie et un temps nuageux persistent juste avant la vendange. La « pourriture noble » peut être obtenue parfois mais son développement est sporadique et imprévisible; on obtient plus souvent l'altération des raisins que la lente dessiccation de la baie.

L'insecte le plus courant nécessitant une lutte est *Erythroneura* pour lequel on utilise des insecticides systémiques. Dans les régions irriguées on trouve parfois des altérations des grappes.

Du point de vue de la vinification l'utilisation tardive de soufre pulvérulent entraîne parfois des problèmes pour la vinification, c'est-à-dire des mauvaises odeurs de soufre difficiles à enlever.

Puisque les raisins mûrissent en présence d'une humidité relativement basse, les pluies précoces en septembre et octobre entraînent des dégâts plus importants que ceux que l'on trouve dans les régions plus humides : éclatement des raisins, pertes de jus et altérations des raisins. Le Zinfandel est tellement sensible à ce sujet qu'il n'est pas cultivé dans les régions où l'on pratique l'arrosage. On utilise des pulvérisations de Gibberelline avant la floraison afin d'obtenir des grappes moins serrées et donc réduire les altérations pour des variétés telles que « Chenin blanc ».

Les pulvérisations et les poudres contenant du cuivre ne sont pas nécessaires et actuellement on abandonne l'utilisation de l'arsénite de sodium pour la lutte contre l'Esca. Quoique la plupart du temps les raisins arrivent aux chais sains et bien mûrs, un contrôle volontaire est pratiqué par les autorités de l'État au quai de réception dans la plupart des grands chais. Actuellement on fait des études sur les méthodes appropriées pour déceler et classer les altérations des raisins par des moisissures dans le cas de récolte faite avec une machine à vendanger.

Le raisin arrive à complète maturité chaque saison et les teneurs en sucre sont généralement élevées. La chaptalisation du moût est interdite par la loi. Dans les chais on accuse les viticulteurs de produire des récoltes surabondantes parce que la vendange est retardée afin d'arriver à une teneur élevée en sucre; l'acidité est donc réduite et le pH élevé. Le rapport entre la qualité du vin et la surface des feuilles ou la composition des fruits n'est pas encore résolu. Les différences inhérentes aux différents cépages empêchent les généralisations. En période de surproduction les contrôles dans les chais deviennent plus sévères et les viticulteurs commencent à diminuer l'importance des récoltes soit par la taille, soit par éclaircissage des fleurs et des raisins; techniques qui furent abandonnées en d'autres temps.

Évolution des variétés cultivées

Le premier vinifera introduit du Mexique en Californie a été planté près de la Mission de San Diego en 1781, 12 années après sa création par les Pères Franciscains. Ce cépage particulier devient connu sous le nom de « Mission » et fut planté plus tard dans les 20 autres missions qui s'étendirent progressivement au nord jusqu'à Sonoma.

C'est apparemment le même cépage que celui introduit par Christophe COLOMB en 1492 et distribué par les explorateurs espagnols. Il est nommé « Criolla » en Argentine, « Negra corriente » au Pérou et « Pais » au Chili. Il donnait plutôt un raisin de table qu'un raisin de cuve; par contre il poussait vigoureusement, avait une grande capacité de production et produisait des fruits dont la teneur en sucre était élevée. Il était employé pour approvisionner les prêtres en raisins de table, sirop, raisins secs, vin et eau-de-vie. Des vignobles furent créés avec succès dans toutes les Missions sauf 3 : Santa Cruz, San Francisco (Dolorès) et San Carlos où le climat était trop frais et trop brumeux pour permettre la maturation des raisins.

Le premier vin fut produit en 1784 à la Mission de San Diego et était consommé pendant les offices religieux et à la table des prêtres (BOWMAN, 1942). La production du vin hors des Missions ne commença qu'après les années 1825 et la chute du régime espagnol. En 1880 la Mission possédait encore 80 p. 100 de la superficie du vignoble en dépit du fait que le vin manquait de couleur, d'acidité et était en général, rejeté pour sa mauvaise qualité.

Dès les années 1830 d'autres cépages furent importés de sources diverses mais surtout des pépiniéristes des États de l'Est. Le « Mission » resta le cépage le plus important au cours de plus d'un siècle jusqu'à ce que le Zinfandel gagnât de l'importance en Californie du Nord et particulièrement dans le Comté de Sonoma il fut largement recommandé pour l'obtention de vin de type « Claret » et fut utilisé diversement.

Le Comte Agoston HARASZTHY soutint le cépage, prétendant l'avoir introduit de sa maison maternelle en Hongrie. Délégué en Europe en 1861, il fut responsable de l'introduction de plus de 300 cépages. Malheureusement à l'arrivée en Californie plusieurs étiquettes des cépages furent perdues ou effacées ce qui a entraîné la confusion des variétés existant encore actuellement.

Ne connaissant ni les qualités, ni la provenance des cépages on plantait couramment en mélange plusieurs cépages, soit sans le savoir, soit tout simplement afin de profiter des avantages du mélange.

Le Zinfandel devint réputé et resta le cépage le plus important jusqu'à ce qu'il soit détrôné par le Carignane pendant les premières années 1960. En 1975 il s'étendait sur 9,1 p. 100 de la superficie totale cultivée en cépages rouges et plusieurs autres cépages étaient devenus assez importants (tabl. 1).

Dans les régions des Contreforts de la Sierra à l'est de Sacramento, plusieurs centaines de petits vignobles furent établis après la découverte de l'or en 1849 et l'extension du travail des mines. Plusieurs cépages obtenus par les pépiniéristes de Sacramento furent plantés; quelques-unes seulement de ces vignobles demeurent et le Zinfandel reste le cépage préféré.

Pendant la prohibition nationale qui commença en 1920, plusieurs viticulteurs restèrent prospères un certain nombre d'années en vendant leurs vendanges aux chais ayant l'autorisation de fabriquer des vins pour les utilisations médicales et religieuses. Cependant le meilleur débouché devenait l'expédition aux populations

TABLEAU I

Superficies plantées en cépages les plus importants en 1975 (California Grapes, Raisins, and Wine, 1975)

Rouge	Acres	Blanc	Acres
Carignane	30 264	French Colombard	26 185
Zinfandel	29 889	Chenin blanc	19 783
Cabernet-Sauvignon	26 788	Chardonnay	11 500
Barbera	20 435	White Riesling	8 308
Grenache	20 067	Palomino	5 593
Ruby Cabernet	18 533	Sauvignon blanc	3 505
Petite Sirah (Calif.)	12 902	Sémillon	3 052
Rubired	12 123	Emerald Riesling	2 869
Pinot noir	11 006	Gewürztraminer	2 616
Alicante Bouschet	6 472	Burger	2 018
Autres rouges	43 169	Autres blancs	11 853
Total	231 648	Total	97 282

d'immigrants, dans les grandes villes, de « juice grapes » pour la vinification d'amateur. Pourtant les raisins de fins cépages, tels que le Riesling, le Cabernet-Sauvignon et plusieurs autres ne supportaient pas bien le transport et de plus les Italiens préféraient les grandes grappes. Plusieurs viticulteurs restèrent prospères plus longtemps en greffant des cépages plus vivaces et plus productifs. L'Alicante Bouschet devint le cépage préféré parce qu'il pouvait être facilement identifié par l'acheteur grâce à son jus rouge; d'autres cépages tels que le Grand noir, le Carignane, le Grenache et le Palomino remplacèrent les premiers cépages peu productifs.

Le marché limité de la vinification d'amateur fut bientôt engorgé et en 1925 plusieurs vignobles étaient abandonnés, entraînant la ruine de presque tous les chais. En 1933 la prohibition fut abolie mais les chais ayant ouvert à nouveau ne trouvèrent que peu de cépages de qualité et la qualité des vins diminua donc.

Le cépage qui joue, depuis 1900, le rôle le plus important dans l'industrie du vin est le Thompson Seedless (Sultanine); il est officiellement classé comme cépage pour la fabrication de raisins secs. Il représentait 45,9 p. 100 de la vendange totale en 1973 et 30,4 p. 100 en 1974. Son importance comme raisin de cuve a baissé de façon régulière avec l'augmentation de la production des nouvelles surfaces plantées en Colombard et Chenin blanc. Par contre sa grande productivité et l'état excellent des fruits le rendent intéressant et il se vend à des prix plus bas que la plupart des autres raisins de cuve. En outre il donne un moût fermentant facilement, un vin neutre qui peut être employé en coupage pour préparer des vins de table. C'est un cépage polyvalent et l'offre et la demande fluctuent largement d'une année à l'autre. Dans les périodes de prix bas, le Thompson Seedless est employé avec les surplus de raisin de table pour la production des eaux-de-vie. Actuellement il possède le grand avantage d'être le cépage qui se vendange le mieux avec une machine à vendanger. Les baies se détachant de la vigne facilement et ne s'écrasent pas.

Le changement le plus spectaculaire dans le choix des cépages se produisit

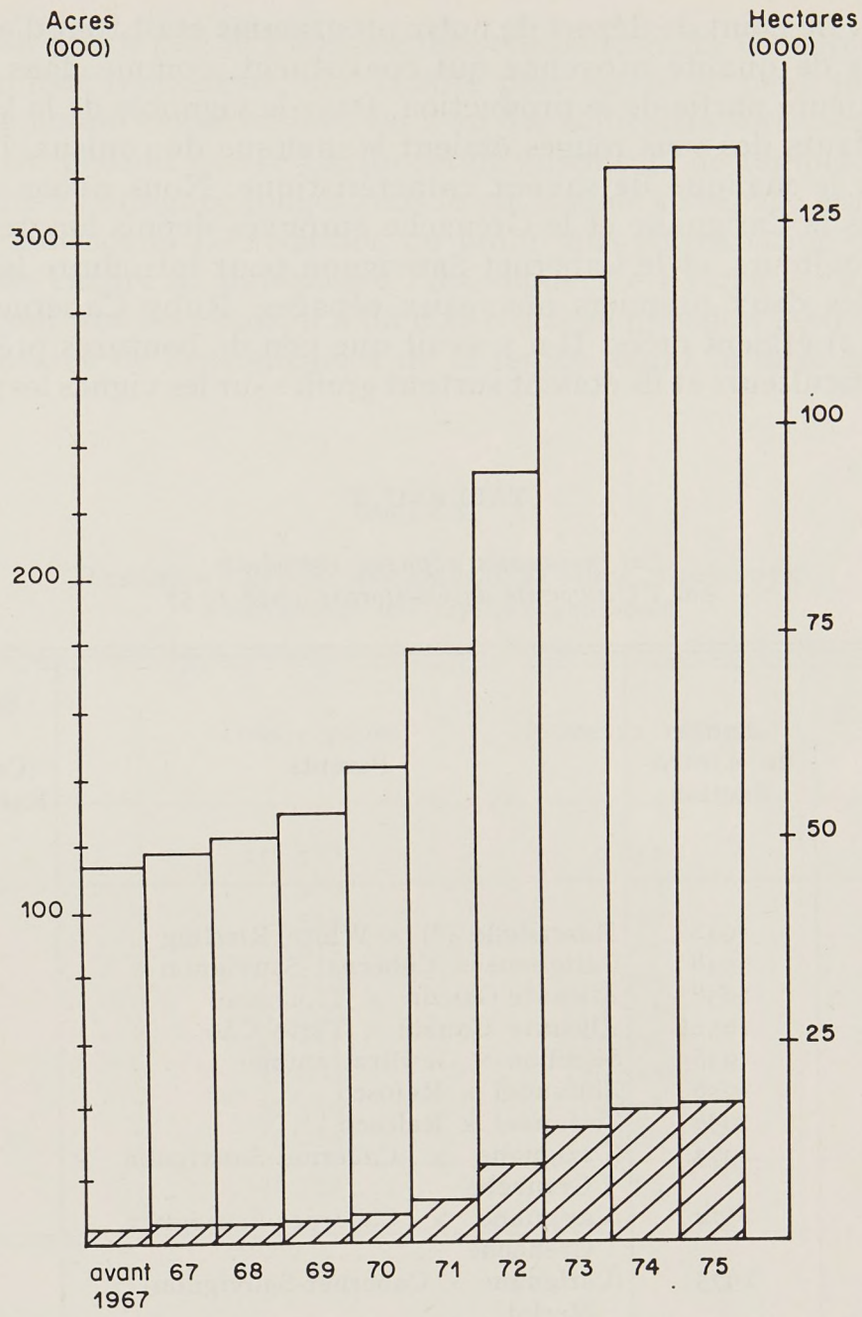


FIG. 2. — *Représentation graphique cumulative des plantations de cépages de 1967 à 1975.*

▨ Cépages nouveaux.

pendant les extensions du vignoble entre 1970 et 1974 (fig. 2). En 1974 le Cabernet-Sauvignon était le cépage le plus important cultivé dans les nouveaux vignobles, suivi par le Zinfandel, le Chardonnay et le Carnélian, le plus récemment introduit.

Rôle des nouveaux cépages

Il n'y a que quelques années, l'essai et l'introduction de cépages nouveaux en Californie rencontrait scepticisme et opposition; la tradition des cépages nobles qui ont résisté à l'épreuve du temps est profondément ancrée. L'exemple de plusieurs hybrides français de qualité inférieure a contribué à renforcer l'attitude

du laissez-faire. Le point de départ de notre programme était tout d'abord l'amélioration des vins de qualité moyenne qui constituent, comme dans tous les pays viticoles, la majeure partie de la production. Dans le vignoble de la Vallée Centrale chaude, les défauts des vins rouges étaient le manque de couleur, l'acidité basse, le pH élevé et le manque de saveur caractéristique. Nous avons utilisé comme cépages parents le Carignane et le Grenache éprouvés depuis longtemps et acceptés par les viticulteurs, et le Cabernet-Sauvignon pour introduire la qualité.

En 1948 les deux premiers nouveaux cépages, Ruby Cabernet et Emerald Riesling (tabl. 2) étaient créés. Il n'y avait que peu de boutures prêtes à être distribuées aux viticulteurs et ils étaient surtout greffés sur les vignes les plus anciennes

TABLEAU 2

Les nouveaux cépages introduits par l'Université de Californie 1948-1957

Nom	Année de l'introduction	Parents	Superficie 1975 (Acres) (California Grapes, Raisins and Wine, 1975)
Emerald Riesling	1948	Muscadelle (*) × White Riesling	2 869
Ruby Cabernet	1948	Carignane × Cabernet-Sauvignon	18 533
Royalty	1958	Alicante Ganzin × Trousseau	3 214
Rubired	1958	Alicante Ganzin × Tinto Cão	12 123
Flora	1958	Semillon × Gewürztraminer	427
Calzin	1958	Zinfandel × Refosco	53
Helena	1958	Zinfandel × Refosco	15
Carnelian (1)	1973	(Carignane × Cabernet-Sauvignon × Grenache	2 430
Centurion (2)	1974	(Carignane × Cabernet-Sauvignon × Grenache	1 389
Carmine (3)	1975	(Carignane × Cabernet-Sauvignon) × Merlot	—

(*) Ne pas confondre avec le Muscadelle de France.
(1) U.S Plant Patent 3675, Sept 24, 1974.
(2) U.S Plant Patent 3870, April 20, 1976.
(3) U.S Plant Patent 3929, June 29, 1976.

et les plus pauvres du vignoble. Aussi les premiers sujets attrapèrent des maladies à virus et les premiers résultats ne furent pas bons. Mais ceci servit de stimulant pour arriver à obtenir des boutures exemptes de maladies et la conséquence fut la première création du premier système de raisins certifiés en 1952 (OLMO, 1975). Il y a peu de doute que ce programme a amélioré la qualité des fruits, tous les nouveaux cépages introduits et brevetés doivent être des plantes certifiées.

Le manque de stabilité de la couleur était encore à déplorer à cause des traiments œnologiques en usage au détriment de la qualité du vin. Le Rubired et le Royalty étaient rapidement acceptés dès leur introduction. Ces deux cépages étaient également choisis pour leur résistance à l'Oïdium permettant de les cultiver sans aucun traitement (OLMO et KOYAMA, 1962).

On accepta peu à peu le Flora comme remplaçant du Gewürztraminer parce qu'il a un meilleur rendement, une acidité plus élevée et peut produire du vin de table sec de bonne conservation. On a eu des difficultés sérieuses avec le Calzin et le Helena. On pensait que le Calzin serait un cépage de remplacement du Zinfandel, résistant à l'araignée rouge, mais le vin issu de ce cépage était trop tanique pour le palais américain. L'extraction du tanin sans perturbation de la couleur et de l'arôme reste encore un défi posé à l'œnologue. Le Helena est un cépage blanc sur lequel on continue les essais; il a dû être remis en question pour avoir contracté le virus responsable de l'enroulement de la feuille avant la mise au point de son brevet.

TABLEAU 3

Plantation annuelle des cépages de cuves, 1967-1975
Pourcentage des cépages nouveaux

	Tous cépages	Nouveaux cépages	P. 100 Nouveaux cépages
Avant 1967	112 588	6 851	0,06
1967	3 989	183	4,6
1968	4 534	240	5,3
1969	7 015	285	4,1
1970	15 118	705	4,7
1971	32 760	3 318	10,1
1972	55 711	11 960	21,5
1973	58 004	10 728	18,5
1974	32 550	4 636	14,2
1975	6 083	1 989	32,7
Totaux	328 352	40 895	12,5

Les trois cépages les plus récents sont les premiers à être brevetés par l'Université. Le Camelian et le Centurion produits à partir d'une plante de semis, sœur de Ruby Cabernet croisée avec le Grenache. Le Carnelian donne un vin rosé de couleur stable qui peut être consommé jeune. On peut également le faire vieillir en bouteille afin d'obtenir un vin supérieur caractérisé par un rendement élevé, une teneur en sucre très élevée (25-26 Brix), une acidité élevée et un pH bas. Le Centurion donne un vin rouge corsé d'un caractère particulier; il peut donner, soit un vin sec si la vendange se fait tôt, soit un vin de type « Porto » s'il mûrit en produisant une teneur élevée en sucre.

Le Carmine est l'introduction la plus récente et la première pour les régions plus fraîches de la côte. Ses avantages principaux par rapport au Cabernet-Sauvignon sont une maturation achevée plus tôt, un rendement plus grand et une saveur et un arôme plus consistants.

La meilleure qualité et les rendements plus élevés des nouveaux cépages ont conduit à leur adoption par les viticulteurs. Le tableau 3 montre l'augmentation de l'importance de ces cépages dans le cadre des plantations annuelles de raisins de cuve. Avant 1967, les nouveaux cépages n'ont couvert que 0,6 p. 1000 de la superficie totale du vignoble de l'État.

La proportion des nouveaux cépages a augmenté d'une manière considérable pendant l'extension spectaculaire du vignoble qui commença en 1969 (fig. 1) (fig. 2). En 1973 l'année de la plus grande extension les nouveaux cépages constituèrent 18,5 p. 100 de la superficie nouvelle (tabl. 3). Bien que les plantations soient descendues à des niveaux plus normaux en 1975, le cépage le plus planté fut un des nouveaux cépages : le Carnelian. Actuellement, les nouveaux cépages introduits par l'Université couvrent 12,5 p. 100 de la superficie totale de l'État. On attend une augmentation plus rapide de ce pourcentage quand les cépages blancs viendront apporter un complément au Colombard et au Chenin blanc.

Summary

Evolution of cultivated wine varieties in California

The geographical and temperature zones of the wine growing regions of California are reviewed. Recommendations made on the basis of temperature regions need modification.

The condition and maturity of the fruit at harvest are exceptionally good because of the relative freedom from diseases and insects, attributed to the nearly rainless and dry summer season.

The principal factor in improving wine quality since the first wine was produced in 1784 is the change in variety base. As late as 1880, the « mission » introduced by the Spanish explorers was predominant and produced poor quality wine. The «Zinfandel» of supposed Hungarian origin became the leading variety until dethroned by Carignane in the early 1960's. Since 1900, the Sultanina (Thompson Seedless) accounted for half the crush, but is being replaced slowly by Colombard and Chenin blanc.

The most dramatic shift in variety preference occurred with the expansion in 1970-74. A table lists the present status of wine varieties.

New varieties bred especially for warmer regions have increased in importance, now occupying 12.5 per cent of the acreage. The most recent introductions for red wine are " Carnelian ", " Centurion ", and " Carmine ". These are patented by the University of California.

Key-words: *Californian wines and cultivated varieties. Californian wines — cultivated varieties — evolution.*

Références bibliographiques

AMERINE M. A., WINKLER A. J., 1944. Composition and quality of musts and wines of California grapes, *Hilgardia*, **15** (6), 493-673.

AMERINE M. A., WINKLER A. J., 1963. California wine grapes: composition and quality of their musts and wines, *Calif. Agr. Exp. Sta., Bull.*, 794.

BOWMAN J. N., 1942. Correspondence and unpublished MS, novembre.

CALIFORNIA GRAPES, RAISINS and WINE, 1975. Production and Marketing, Calif. Crop and Livestock reporting Service, Sacramento, août 1976.

OLMO H. P. KOYAMA, A., 1962. Rubired and Royalty, *Calif. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 789.

OLMO H. P., 1975. The California grape certification program, I° *Semana International del Vino*, Junio, Consejo Provincial de Empresarios de Cadiz, Jerez (Espagne).

U.S. Plant Patent n° 3625, « Carnelian ».

U.S. Plant Patent n° 3870, « Centurion ».

U.S. Plant Patent n° 3929, « Carmine ».

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 27-29.

INTERVENTION

La vigne et le vin en Irak

I. ALSAIDI

Faculté d'Agriculture, Université de Mosul (Irak)

La viticulture est devenue, en Irak, un secteur économique important. Elle tient compte maintenant des données scientifiques modernes et l'implantation des cépages se fait dans des zones délimitées.

La superficie totale de l'Irak est de 43 492 000 ha. Les terres agricoles en occupent 10 163 000 et 711 000 doivent être irriguées. La vigne en production couvre une superficie de 20 000 ha et pousse dans toutes les régions du pays.

Les conditions climatiques

La situation géographique de l'Irak et les régions très variées qu'on y trouve offrent des conditions naturelles très bonnes, pour l'extension de la plantation de la vigne.

Il est possible de distinguer trois régions climatiques, les régions du Nord (Arbil, Nineveh, Ta'amim), du Midi (Diala, Baghdad, Anbar, Kerbela, Wasit) et du Sud (Qadisiya, Thi-qar, Basrah).

Températures

Les moyennes des températures annuelles de l'air varient de 12 à 28° dans la région du Nord, de 14 à 31° dans la région du Midi, et de 15 à 31° dans la région du Sud.

Les moyennes des températures maximales et minimales des mois les plus chauds et les plus froids dans chaque région sont 43,8° (août) et 0,4° (janvier) au Nord, 44,0° (juillet) et 1,6° (janvier), au Centre, 43,9 (août) et 4,1° (janvier) au Sud.

Les minima et maxima de température absolue sont : 51,5° (juillet) et 11,1° (janvier) au Nord, 51,2° (août) et 8,9° (janvier) au Centre, 51,7° (juillet) et 8,3° (janvier) au Sud.

Précipitations

Elles varient fortement suivant l'année. La moyenne des pluies varie de 400 à 700 mm dans la région du Nord, de 100 à 300 mm dans la région du Centre et se situe aux environs de 120 mm dans la région du Sud. Ces chiffres expliquent que l'irrigation soit pratiquée dans toutes les régions sauf dans la région du Nord.

On peut faire une distinction entre les mois très humides (décembre, janvier, février), les mois humides (mars et novembre), les mois semi-humides (octobre et avril), les mois semi-secs (mai et septembre) et très secs (juin).

Les régions viticoles

Elles correspondent aux trois grandes régions précédentes. Chacune est caractérisée par un encépagement particulier et des pratiques culturales comparables.

Production

La production totale est de l'ordre de 47 millions de kg dans la région du Nord, de 84 millions dans la région du Centre et de 25 millions dans la région du Sud.

Variétés

Dans la région du Nord.

On trouve les cépages suivants : Sadany blanc, Sadany noir, solobi, Zarigue, Mirany, Bohrizy, Kichmichi d'Arbil, Taifi, Kamali, Dais-anz, Tari-rash, Thompson seedless, Shada noir, Ahmar maourdi, Rach-maiou, Khochnow, Baid al hamam.

Dans les régions du Centre et du Sud.

Les cépages sont les suivants : Shada noir, Khalili, Bohrizy, Sahada blanche, Perlette, Kichmichi de Basrah, Thompson seedless, Blank monukka, Abasy noir, Kamali, Agemi, Dais-anz, Hilawi, Black Hamburg, Kichmichi de Diala. Il y a encore d'autres varités telles que Shirazi, Black corinth, Emperor, Tokay, Romy rouge, Romy blanc, Halwani noir mais elles sont beaucoup moins cultivées. Toutes ces variétés sont reproduites par bouturage car le Phylloxera n'existe pas en Irak. La récolte commence à partir du 15 juin. Elle a lieu surtout entre le 1er juillet et le 30 septembre et se termine au 15 novembre.

Modes de conduite

Dans la région du Nord.

Les vignes sont basses. Les souches ont une tige courte de 20 à 50 cm de hauteur. Ces vignes ont un système de taille courte sans palissage (formes en gobelet).

Dans les régions du Centre et du Sud.

On trouve généralement des vignes hautes qui sont conduites en espalier, en cordon, en pergola ou en formes irrégulières. Le système de taille employé dans ces régions est la taille longue et mixte.

Utilisation des produits de la vigne

La plus grande partie de la production est consommée comme raisin de table. La production de raisins secs est insuffisante et l'Irak en importe beaucoup. La consommation de vin est limitée et l'Irak en importe aussi. Par distillation des vins on obtient un alcool connu sous le nom d'Arak. Les jus de raisin sont consommés sous forme de boissons. On utilise enfin des moûts concentrés.

L'amélioration de la viticulture en Irak

Les principaux problèmes qui se posent à la viticulture irakienne sont les suivants :

— Certains cépages ne sont pas plantés dans les régions les plus favorables.

— Dans les anciens vignobles, la vigne est toujours cultivée avec des arbres fruitiers.

— Les modes de conduite et la taille ne sont pas bien réalisés.

— La fertilisation et l'irrigation ne sont pas utilisées de façon rationnelle.

— La lutte contre les maladies et les parasites n'est pas faite comme il faudrait.

Pour améliorer la viticulture et la qualité des produits, il faut donc implanter les variétés en fonction des conditions pédo-climatiques favorables et des possibilités d'irrigation, déterminer la taille qui convient à chaque variété, entreprendre des essais avec des cépages étrangers et introduire les meilleurs dans les différentes régions du pays. Il faut enfin augmenter la surface réservée aux variétés apyrènes pour éviter l'importation des raisins secs.

Tout ceci suppose la formation de spécialistes viticoles irakiens et le rôle des facultés d'agriculture dans ce domaine apparaît important, notamment celle de Mosul qui a été la première à inclure un cours de viticulture dans les programmes d'enseignement supérieur en Irak et qui va maintenant introduire un cours d'Œnologie. Il apparaît nécessaire aussi d'envisager une collaboration avec les spécialistes de la Vigne des autres pays.

Conclusion

La viticulture en Irak prend actuellement une nouvelle orientation qui l'amène à abandonner les anciennes méthodes pour créer des vignobles modernes. Dans le cadre du développement planifié de la viticulture, l'état soutient à la fois l'effort technique et scientifique qui est réalisé et l'extension des plantations qui est maintenant faite de façon rationnelle.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 31-40.

Le vignoble et le vin de Porto

E. SERPA-PIMENTEL

Institut du vin de Porto (Portugal)

Résumé

L'auteur fait tout d'abord l'historique de la région du Douro depuis le Ier siècle avant J.C. Il décrit la première délimitation en 1757, exposant ensuite les raisons qui ont conduit à de nouvelles. délimitations jusqu'à nos jours.

Il étudie les trois facteurs qui sont la base de la grande qualité et individualité du vin de Porto : le sol, le climat et les cépages.

Il fait une analyse succincte de la création et de l'évolution du vignoble, notant les maladies et accidents subis par la vigne. Il expose l'évolution de la fabrication du vin de Porto.

L'auteur fait une analyse des procédés de maturation par oxydation et réduction et termine en décrivant la classification et la définition des divers types de vin de Porto, les modalités du contrôle de la qualité par l'Institut du vin de Porto ainsi que l'importance de ce contrôle aussi bien pour le produit lui-même que pour la défense du consommateur.

Il envisage enfin la valeur du vin de Porto non seulement du point de vue social mais aussi du point de vue économique.

Mots clés : *Vin de Porto. — Vignoble. — Fabrication historique. — Évolution.*

Introduction

La culture de la vigne dans la région du Douro remonte à des temps immémoriaux. Signalée dès l'époque pré-romaine, rapportée par ESTRABÃO, géographe grec du Ier siècle avant J.C., elle a été confirmée par de nombreuses fouilles, notamment celle de « Fonte do Milho » (dominant la vallée de Covelinhos) et de la « Quinta da Ribeira » (rive gauche du fleuve Tua, près de son embouchure).

La culture de la vigne est également citée dans le code visigothique du VIIe siècle, ainsi que dans les coutumes des XIe et XIIe siècles, où sont cités des cas de paiements de droits foraux avec du vin.

Après le XVIe siècle, des cépages sont connus, tels les Bastardo, Trincadeira, Castelão, Lameiro, Terrantês, Donzelinho et d'autres.

Selon les textes de l'époque l'excellence de la qualité du vin produit sur les

côtes ensoleillées était connue en Angleterre. Ce vin a été exporté par les ports de Viana do Castelo et Porto.

C'est vers 1678 qu'on note le premier enregistrement d'exportation par le port du Douro. La moyenne annuelle des exportations était de 3 850 hl (700 fûts), entre 1680 et 1689, de 104 500 hl (19 000 fûts) entre 1716 et 1749, au taux très élevé de 60 à 72 « mil reis » le fût.

Après le traité de Methwen avec l'Angleterre, l'exportation du vin de Porto a connu un grand développement auquel nous n'étions pas préparés, la culture de la vigne s'étant développée le long de la vallée du Douro en des zones moins appropriées où, par conséquent, les vins étaient de qualité inférieure.

D'autre part, les exportateurs s'efforçaient d'acheter du vin à bas prix, afin de réaliser de forts bénéfices.

Il était nécessaire de remédier à cela. Sous le règne du roi Joseph Premier, à l'initiative de son premier ministre, le Marquis de Pombal, et à l'insistance des producteurs du vin de Régua, a été fondée le 10 septembre 1756 la Compagnie Générale de l'Agriculture des Vignobles du Haut-Douro, ayant des privilèges spéciaux, et qui était chargée de maintenir la discipline dans la production et dans le commerce. Pour cela, on a procédé à la délimitation de la région du Douro, créé le cadastre viticole, fixé la production moyenne d'après les cinq dernières années et établi les divers types de vins et leurs cotations respectives. Ce furent les premières mesures de contrôle de la qualité prises dans le monde.

Plusieurs arrêts ont été promulgués, notamment celui qui interdisait l'utilisation des engrais (privilège royal du 30 août 1757) ainsi que celui qui établissait les règles du commerce.

Grâce à de telles lois, la région du Douro connut une des plus brillantes époques de son histoire, ce qui évidemment, se traduisit par un nouveau développement de la région en amont du fleuve. Cependant près de S. João da Pesqueira existait dans le fleuve une chute d'eau abrupte, empêchant la navigation, seul moyen existant à cette époque pour la sortie du vin de la région. Sous le règne de la reine D. Maria I, des travaux qui durèrent de 1780 à 1792 rendirent possible la navigabilité du fleuve par delà cette chute d'eau. Après ces travaux la région a recommencé à se développer, provoquant une nouvelle délimitation.

Beaucoup plus tard, le 16 mai 1907, le 27 novembre 1908 et le 10 décembre 1961 de nouvelles délimitations ont été faites dont la dernière est encore en vigueur aujourd'hui.

Cette dernière délimitation correspond à une surface d'à peu près 250 000 ha dont 25 000 environ sont cultivés.

La dernière de toutes ces mesures a été la création de l'Entrepôt de Vila Nova de Gaia où se trouvent obligatoirement tous les chais d'exportateurs et qui peut être considérée comme une extension de la région du Douro.

La région du Douro s'étend le long de la vallée du Douro et de ses affluents, depuis Barqueiros jusqu'à Barca d'Alva, seule zone où l'on produit le véritable vin de Porto. C'est une région très caractéristique, formée de pentes escarpées, abruptes et rocheuses.

Sol

Tout ce que l'on peut dire sur le sol de la région du Douro c'est qu'il n'existe pas. En effet, si on cherche un sol dans une région qui n'a jamais été cultivée, on ne le trouve pas. C'est seulement à l'occasion du défoncement du terrain qu'on

« fabrique » le sol par le fractionnement de la roche-mère. La plupart des terrains de cette région appartiennent aux schistes du Cambrien et du Précambrien, le long de la vallée du fleuve Douro et de ses affluents.

Toute cette région est pratiquement environnée par une formation géologique protectrice d'origine granitique, qui en certains cas atteint le fleuve Douro. On peut constater ce fait en amont de Foz-Tua, Cachão da Valeira et Ferradosa, et aussi près de Louza, en aval de Foz de Sabor.

Parfois, dans les zones schisteuses apparaissent des affleurements granitiques, principalement ceux de Freixo de Numão, Seixo de Numão et un troisième entre Fontelo de Sande.

Climat

La région du Douro, entre Barqueiros et Barca d'Alva constituée par la vallée du Douro, son épine dorsale, et de ses affluents, se situe autant au Nord qu'au Sud, à diverses longitudes et altitudes; mais jamais elle ne s'éloigne beaucoup de la vallée du fleuve.

Toute la région est formée de profondes vallées protégées par des montagnes plus ou moins hautes.

Le Douro, un peu en aval de Barqueiros et justement où commence la région du Douro, fait un « S » très marqué entre deux collines élevées et de pente abrupte qui préservent la région des vents humides de l'Atlantique.

L'orientation du Douro est sensiblement Est-Ouest.

Sur la rive droite du Douro on remarque un ensemble de montagnes qui protègent des vents froids du Nord, avec des altitudes variant de 730 m (Candoso) à 1 415 m (Marão).

La rive gauche est aussi bordée par une chaîne de montagnes avec des altitudes allant de 730 m (S. Domingos de Queimada) à 1 380 m (Montemuro).

C'est cet ensemble de montagnes qui donne à la région des caractéristiques climatiques très particulières. Son climat est caractérisé par des précipitations peu importantes diminuant d'aval en amont du Douro. Les précipitations mesurées à Régua sont d'environ 900 mm par an, tandis qu'à Pinhão, Tua Barca d'Alva, elles sont respectivement de 700, 500 et 400 mm.

Ces valeurs s'élèvent aussi, irrégulièrement, quand on s'éloigne des rives du fleuve et, par conséquent, quand l'altitude augmente. Il est remarquable que les précipitations moyennes à Porto, distant d'à peu près 65 km de Barqueiros, soient de 1 200 mm.

De la même façon, mais en sens inverse, la température moyenne augmente, quand on remonte le cours du fleuve. Quant à Porto sa valeur moyenne est de 16°, à Régua, Pinhao, Tua, Barca d'Alva, elle est, respectivement, de 18°, 19°, 20° et 21°.

En moyenne la somme des températures actives (T-10 °C) pendant la période végétative est de 1 837 °C et la moyenne hydrie (Thorn) est de — 20° et +20°.

Les neiges sont rares mais, par contre, les gelées blanches à la fin de l'automne et au commencement de l'hiver sont fréquentes et très fortes. Au printemps, généralement, elles ne sont pas à craindre.

En conséquence, on peut considérer dans la région trois climats différents qui, d'aval en amont du fleuve, sont du type atlantique, atlantique-méditerranéen et méditerranéen. C'est, en général, la région de climat atlantique-méditerranéen qui produit les Portos les plus fameux.

Cépages

Le vin de Porto peut être produit à partir de cépages rouges et blancs. On rencontre autant les uns que les autres groupés en trois catégories : recommandées, autorisées et tolérées.

Recommandées

Rouges. — Bastardo, Donzelinho Tinto, Mourisco, Touriga Francesa, Tinta Roriz, Tinto Cáo et Touriga Nacional. *Blanches.* — Donzelinho, Esgana-Cão, Folgasão, Gouveio ou Verdelho, Malvasia Fina, Rabigato et Viosinho.

Autorisées

Rouges. — Cornifesto, Malvasia Preta, Mourisco de Semente, Periquita, Rufete, Samarrihno, Tinta Amarela, Tinta da Barca, Tinta Barroca et Touriga Brasileira. *Blanches.* — Arinto, Boral, Cercial, Codega, Malvasia Corada et Moscatel Galego.

Tolérées

Rouges. — Alvarelhao, Avesso, Casculho, Castela, Coucieirã, Moreto, Tinta Bairrada, Tinta Carvalha et Tinta Martins. *Blanches.* — Branco sem Nome, Fernão Pires, Malvasia Parda, Pedernão, Praça et Touriga Branca.

On pourra trouver étrange que dans une région délimitée et productrice de vins de si haute qualité, il existe une si grande variété de cépages.

Mais, si nous nous rappelons de ce que nous avons dit au sujet du climat, en tenant compte du relief de la région, avec des différences d'altitude très marquées et des pentes très fortes, des diverses expositions qui en découlent, et encore des grandes différences de température et de précipitations, qui peuvent être du simple au double, on peut comprendre une aussi grande diversité de cépages.

Fréquemment, le même cépage ou ensemble de cépages produit des vins de qualité différente, sous la même longitude, quand on passe par exemple de la côte 100 à celle de 200 ou 500 m.

On peut constater le même phénomène quand, à la même altitude — 150 m, par exemple —, on change de méridien et on passe de celui de la Régua à celui de Pinhão ou Barca d'Alva.

D'autre part, et comme on le verra plus loin, le vin de Porto est essentiellement un vin d'assemblage, en commençant déjà aux vignobles.

Ces trois facteurs sont si intimement liés : le sol, le climat et le cépage que, changeant l'un d'entre eux, on ne peut pas obtenir le vrai vin de Porto.

Il est vrai que la résultante dépend toujours des forces concourantes.

Préparation et ameublissement des sols

Un bon ameublissement du sol est une pratique fondamentale et indispensable pour l'installation rationnelle de la vigne.

L'ameublissement atteint généralement la profondeur de 1,20 à 1,50 m. Ce

travail était fait autrefois au moyen de barres de fer pointues et de pelles, le recours à l'emploi de la poudre n'étant pas rare pour détruire les schistes plus durs et plus résistants. Les plus grosses pierres étaient utilisées pour la construction de murs qui supportaient les différents « calços » ou « geios » que nous pouvons voir encore sur plusieurs versants.

Aujourd'hui ce travail est fait à l'aide de machines très puissantes, avec des pelles très tranchantes. Les terrasses ont été remplacées par des talus.

Quand on visite la région et regarde les versants, on croit se trouver devant un grand escalier, dont les marches sont de vieux « geios » qui varient de largeur selon la pente naturelle.

L'étude de nouveaux modes d'ameublissement des sols a permis d'établir de nouvelles techniques qui sont appliquées dans les nouvelles plantations où la mécanisation est déjà possible sur une large échelle.

Au début les terrasses suivaient plus ou moins les courbes de niveau. Il en résultait des terrasses étroites et plates.

Plus tard, on a fait des lignes polygonales, obtenant des terrasses plus larges avec une pente plus ou moins accentuée.

Avec le remplacement des murs par des talus, on est revenu à peu près aux courbes de niveau obtenant des terrasses horizontales, plus larges que les premières, par une grande hauteur donnée aux talus.

Plantation

La plantation est faite en lignes parallèles aux limites longitudinales des « geios ». Les écartements les plus fréquents sont de 1,3 × 1,10 m avec tendance à augmenter, surtout dans les zones où la mécanisation est déjà possible ou prévue, étant donnés les progrès des machines viticoles. On pense, cependant, qu'elle ne sera jamais supérieure à 1,8 × 1,5 m.

Le porte-greffe le plus utilisé encore aujourd'hui est le *Rupestris du Lot* qui s'est révélé depuis l'invasion du phylloxera en 1862 comme un des meilleurs.

Plus récemment on utilise également les hybrides de *Berlandieri*, soit avec la Riparia, tels que le 420-A, le SO_4, le 161/49, etc., soit avec le Rupestris, tels que le R.99, le R.110, etc.

Les premiers sont utilisés dans les terres les plus abruptes et les plus fraîches et les seconds sur les pentes chaudes, sèches et rocheuses.

La taille la plus utilisée est celle de Guyot, double, à 5 ou 6 yeux, ce qui avec ceux des coursons, donne une production totale de 14 à 16 yeux par pied ou, de 95 à 100 000 yeux par ha.

Maladies, parasites et accidents de la vigne

Les maladies les plus fréquentes sont le mildiou et l'oïdium. L'oïdium s'est montré pour la première fois vers 1851; ceci fut la première catastrophe du Douro. Le mildiou a fait son apparition vers 1893, occasionnant des dommages très importants.

Des accidents ont été détectés (la première fois en 1845) : « Maromba », « Mal Negro » ou « Gomose », considérés comme pouvant être une virose, ce qui heureusement ne s'est pas vérifié. Il s'agit purement et simplement d'une carence en bore.

Vinification

Le vin de Porto, surtout le rouge, est caractérisé par sa couleur foncée et par un extrait élevé. Pour obtenir ce résultat il est nécessaire que les raisins subissent un travail de foulage très intense avant la fermentation. De cette façon seulement on peut obtenir l'extrait et la couleur indispensables par la dissolution des polyphénols, alors que les cépages rouges régionaux ne sont pas teinturiers. Rappelons encore que le moût est séparé des pellicules et de la rafle du raisin avant la fermentation totale du sucre, ce qui limite beaucoup le temps de dissolution de la matière colorante. C'est pourquoi il est nécessaire que le foulage très rapide des raisins soit parfait.

Traditionnellement, les raisins étaient jetés dans des cuves (lagares) faites en général de granit, dont les bords avaient environ 60 cm de hauteur et sans aucun foulage mécanique. C'était un travail fait exclusivement par des hommes.

Après l'apparition des fouloirs le travail humain est devenu un peu moins pénible. Le moût était travaillé sans interruption, avec repos seulement pendant la nuit et quelques heures avant le décuvage afin de faire lever complètement le chapeau facilitant ainsi le décuvage.

Avec le manque de main-d'œuvre on a eu recours aux cuves de fermentation, ouvertes ou fermées. Les premières, munies de systèmes de remontage et les deuxièmes avec remontage non automatique. Avec plus ou moins de succès on a obtenu des résultats satisfaisants, mais il est nécessaire de prolonger les recherches, le procédé traditionnel de foulage restant encore le meilleur.

La période de fermentation est plus ou moins prolongée, non seulement à cause du degré en sucre des moûts, mais aussi suivant le degré de moelleux que l'on désire obtenir dans le vin terminé.

La fermentation étant arrivée au point désiré, en général quand on atteint 7,5° Baumé de densité, on pratique le décuvage, faisant à ce moment-là l'addition d'eau-de-vie de vin, entre 100 et 110 l pour 450 à 440 l de moût, qui doit titrer légalement 76 à 78° à 20°. En procédant de cette façon on peut obtenir un vin avec 3° Baumé 19°.

Quand le décuvage est fini, on procède à l'assemblage dans le but d'obtenir une homogénéité parfaite et on laisse en repos jusqu'à décembre ou janvier suivant, époque à laquelle on pratique le soutirage.

Maturation

Les vins faits selon le procédé ci-dessus restent jusqu'au mois d'avril ou mai, moment où ils commencent à être transportés aux chais de Vila Nova de Gaia. Les vins sortent de la région accompagnés de certificats de circulation accordés par la « Casa do Douro », Organisme deViticulture qui garantit l'origine et ils ne peuvent entrer à l'Entrepôt qu'après avoir été dégustés et analysés par l'Institut

du Vin de Porto qui donne son agrément, effectuant ainsi le premier contrôle de la qualité. Une fois les vins dans les chais de Vila Nova de Gaia, commencent les premiers travaux d'assemblage, dans le but d'obtenir des types de vins selon le goût des exportateurs, ce travail étant effectué sous la surveillance de dégustateurs, techniciens avérés, de sensibilité gustative développée, ayant une parfaite connaissance des travaux à réaliser. Ce sont de véritables « éleveurs » de vins.

Vins vieillis en fût

Outre des assemblages entre vins de la même ou de plusieurs « quintas » et la préparation de différents coupages, on pratique des soutirages (tout au moins une fois par an) qui, outre la séparation des dépôts formés, garantissent une indispensable dissolution de l'oxygène de l'air.

Les premières années, il n'y a guère d'indication quant à la capacité des futailles. On utilise ainsi bien des cuves que des tonneaux, quelques-uns de grand volume; « fûts » (à peu près 650 l) en bois de chêne, cuves en ciment avec revêtement intérieur, cuves en acier inoxydable.

Le milieu oxydant indispensable à la maturation est obtenu par les soutirages avec aération, ce qui autrefois se faisait avec un broc, en jetant le vin de haut sur des entonnoirs. Aujourd'hui, on obtient ce résultat en laissant tomber le vin dans des baquets d'où il est pompé dans de nouvelles futailles.

Toutes les fois que l'on réalise des soutirages et quand l'analyse et l'observation du vin le conseillent on renforce le degré alcoolique.

On peut également faire des « rafraîchissements » — addition au vin d'une petite quantité de vin plus jeune — si une telle opération s'avère nécessaire.

Une fois constitués les divers coupages et pour obtenir un degré convenable de maturation, il est d'usage de placer le vin dans des futailles de plus petite capacité : tonneaux plus petits ou fûts. Les soins se poursuivent.

A la fin, une fois acquis le degré de maturation désiré, on prépare les derniers assemblages, selon les types de chaque Maison, avant la mise en bouteilles ou l'exportation en vrac.

Pour ces vins vieillis en fûts de bois, les opérations de cave sont des pratiques technologiques très délicates. Ce sont ces opérations de cave qui révèlent en grande partie le niveau professionnel des Maisons.

Les phénomènes de maturation sont intimement liés à la formation d'aldéhydes et, principalement, aux transformations des anthocyanes, estérifications, etc. Les facteurs fondamentaux pour la réalisation de ces phénomènes où certains cations métalliques paraissent être catalyseurs ou fixateurs d'oxygène sont, en en premier, la qualité de la récolte, puis le maintien du milieu oxydant par la bonne opportunité des soutirages, l'intensité de l'aération, la compensation de l'alcool évaporé par l'addition d'alcool de vin et, si nécessaire, le « rafraîchissement » garantissant la poursuite des transformations des anthocyanes des vins dans lesquels ils se trouvent encore peu polymérisés.

Au-delà des transformations gustatives du vin, la couleur est une des caractéristiques qui subit la plus grande modification avec la maturation. Son intensité diminue en changeant graduellement de tonalité au cours du temps; les tonalités rouges diminuent et les tonalités chataîgne augmentent.

Ces changements de couleur se décrivent en général par les termes « rouge »

et « blond-doré »; usuellement on utilise la définition de gradations telles que « rouge foncé », « rouge », « rubis », « blond-doré » et « pelure d'oignon ».

Dans les vins blancs la transformation de la couleur est moins accentuée, pouvant inversement devenir plus foncée avec l'âge, en passant successivement du blanc pâle au paille et aux tonalités plus ou moins chargées de doré.

Dans la période précédant la commercialisation, la mise en bouteille ou l'exportation, on s'applique aux derniers assemblages, de façon à garantir la continuité de la qualité des diverses marques de chaque maison.

Pour obtenir la stabilisation du vin, on commence à recourir avec un certain succès à l'emploi d'agents physiques (froid et chaleur), conjointement à la technique traditionnelle qui utilise un collage.

Les chais de conservation n'ont rien de particulier. Ce sont de vastes constructions qui, à cause des conditions locales, — exposition dominante au nord et proximité du Douro — garantissent des variations thermiques réduites tout le long de l'année.

Pratiquement, il n'existe aucune différence entre les techniques employées pendant la maturation, qu'elles soient effectuées à Vila Nova de Gaia ou qu'elles soient effectuées dans la région productrice du Douro.

Le vin de Porto ne peut pas être vendu dans le pays ou exporté sans un minimum de trois années d'âge. Pour renforcer cette disposition, le volume de vente de chaque Maison est mis en relation avec les stocks vérifiés le 31 décembre de chaque année et avec les achats effectués lors de la récolte antérieure.

Vins vieillis en bouteille

Ce sont des vins d'une seule récolte correspondant à la définition du type *Vintage* et *Late Bottled* et satisfaisant aux déterminations des règlements respectifs. Après quelques années en fût, ils sont mis en bouteille. Mais, dans la bouteille, le processus de vieillissement est différent de celui qui a été exposé ci-dessus, comme nous verrons plus tard. Cependant, on doit reconnaitre que ce n'est pas seulement la technologie qui conduit à ces types de vins, mais principalement la qualité de la récolte. Seulement en années exceptionnelles, on obtient des produits ayant une évolution satisfaisante.

Ainsi quand la qualité de la récolte se révèle exceptionnelle, les vins sont soumis à des techniques un peu particulières.

Cette qualité remarquable ne découle pas de quelques phénomènes de surmaturation mais du fait qu'un parfait équilibre entre tous les composants du raisin est atteint.

On pense que l'ensemble zymologique atteint dans ces années-là la meilleure composition.

Même pour les récoltes les plus remarquables, à peine une petite partie des vins va vieillir en bouteille, car on ne destine au « vintage » que les vins de la plus haute qualité, provenant des « quintas » situés dans les lieux de plus grande réputation.

Les soutirages sont moins nombreux pour éviter l'aération excessive. Pour ces vins on n'utilise pas de cuves en ciment. Aux futailles en bois, telles que les cuves et les tonneaux, on préfère les fûts pour garantir une aération parcimonieusement dosée et uniforme.

Si les dégustations successives confirment la haute qualité et la parfaite évolution de la récolte, les vins sont soumis à l'appréciation de la « Junta Consultiva » de l'Institut du Vin de Porto. Si cette appréciation est favorable, ils sont alors mis en bouteilles avant trois ans d'âge pour les types « Vintage » et 4 ou 5 ans pour les types « Late Bottled ».

Les bouteilles, couchées, sont mises en des caves d'une température aussi uniforme que possible, sombres, d'un degré hygrométrique et d'une ventilation réglables.

Une fois consommé dans les transformations des anthocyanes et d'autres composés oxydables l'oxygène atmosphérique dissous lors de la mise en bouteille, le vin, à l'abri de l'air, se trouve en milieu réducteur.

L'insolubilisation de la matière colorante est beaucoup plus lente que celle que l'on constate en futailles de bois et d'une façon différente. Les vins conservent un fruité caractéristique, une somptuosité qui n'exclut pas une certaine permanence de jeunesse.

Ce sont des vins très corsés au début, qui maintiendront le long des années une grande richesse en extrait et une couleur riche dans laquelle les tonalités violettes prédominent. Ceci peut sans doute être attribué à une petite formation d'aldéhydes et à une légère précipitation de ces composés plus ou moins condensés avec les polyphénols.

On pense également que les réactions provoquées par la maturation à l'abri de l'air conduisent à une évolution particulière des anthocyanes (disparition moins importante des leucoanthocyanes, plus grand pourcentage de formes peu condensées) étant entendu que ces phénomènes ne se vérifient pleinement que lorsque le raisin atteint certains niveaux de maturation, de qualité et d'équilibre de composition.

Valeur économique

La région productrice comprend à peu près 25 000 viticulteurs qui, dans les dernières années, ont produit en moyenne 1 156 430 hl; 180 000 personnes environ y travaillent; 55 Maisons exportatrices occupant environ 3 500 personnes ont un stock qui tourne autour de 800 000 hl.

Le volume des exportations en 1976 a été de 410 967 hl d'une valeur de 1 720 000 milliers d' « escudos ». Il est intéressant de noter que le volume des exportations des vins mis en bouteille à la production a augmenté extraordinairement. Ainsi en 1972 on a exporté 72 586 hl (16,7 p. 100 de l'exportation totale) tandis qu'en 1976 on a exporté 153 128 hl (37,2 p. 100 de l'exportation totale).

Pour les ventes à l'intérieur du pays on doit signaler l'extraordinaire augmentation vérifiée en 1976 et qui s'est traduite par 62 345 hl contre 40 683 hl en 1975, soit plus 65,2 p. 100.

Garantie de la qualité

Elle est assurée à la production par la « Casa do Douro », Organisme de Viticulture et par l'Institut du Vin de Porto. Quant à la commercialisation, la qualité est assurée par ce dernier organisme, par le contrôle analytique et organoleptique de tous les vins, l'attribution des certificats d'origine, indication d'âge ou de date

de récolte et encore l'apposition de sceaux de garantie pour les vins mis en bouteille à la production.

Ce contrôle de qualité est pratiqué d'une telle façon que tout le monde l'accepte et s'y soumet, ce qui renforce le prestige dont le vin de Porto jouit dans le monde depuis toujours.

Summary

The Porto vineyard and wines

The history of the Douro region since the first century AD. is first discussed, followed by a description of the drawing up of the first set of boundaries in 1757 and hence the reasons for subsequent boundary changes up to the present day.

The three factors wich constitute the basis for the production of high quality and individualized Porto Wines, the sun, the climate and the grape varieties are studied.

A concise analysis of the introduction and development of vineyards is presented noting the diseases and accidents suffered by the wines. The development of wine making in Porto is presented.

An analysis of the procedure of maturation by oxidation and reduction is given, finishing with a description of the classification and definitions of the various types of wine from Porto, the methods of quality control imposed by the Wine Institute of Porto as well as the importance of this control for both the product itself and the protection of the consumer.

The value of Porto wines from the social as well as the economic point of view is discussed.

Key-words: *Porto wines — Vineyard — Century-old wine production — Evolution.*

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 41-52.

Les vignobles et les vins de Roumanie

S. C. TEODORESCU

Universitatea din Craiova (Roumanie)

Résumé

Située au bord de la mer Noire, au nord du Danube, la Roumanie présente toutes les formes de relief, dominées par la chaîne des Carpathes. En 1975, la superficie viticole totale était de 330 642 ha dont 139 000 plantés en cépages de cuve de qualité supérieure; ceux-ci sont situés dans des régions délimitées, sur les versants de la zone des collines, la moitié des vignes étant enterrée pendant l'hiver. L'emplacement géographique des principales régions viticoles, les caractères du climat et des sols, les encépagements utilisés, sont précisés.

La Roumanie produit tous les types de vins de qualité : rouge et blancs secs, blancs demi-secs et doux, muscats, vins mousseux; la composition sommaire de quelques échantillons est présentée.

L'étude climatique et œnologique dans 10 régions et pendant 10 ans sur les cépages cultivés permet de constater que les grands millésimes sont caractérisés par des températures et des ensoleillements plus élevés et surtout par des précipitations, d'avril à septembre, plus faibles.

On a tenté de définir le caractère favorable, c'est-à-dire les aptitudes climatiques (F) des diverses régions viticoles nécessaires à l'obtention de vins rouges de qualité en choisissant comme critère la quantité de matière colorante accumulée dans le raisin. Si l'on considère la somme des températures (T) d'avril à septembre, la durée d'insolation (I) et la hauteur des précipitations (P), la relation $F = T + I - (P - 250)$ montre qu'au-dessous de 4 300 les régions présentent une faible aptitude; de 4 300 à 4 600 une aptitude limitée; au-dessus (de 4 600 à 5 100), les régions présentent de bonnes aptitudes climatiques à la culture de la vigne; la validité de cette relation reste cependant limitée vers le haut parce que, à partir d'un certain seuil, trop de chaleur et d'ensoleillement deviennent nuisibles pour la qualité des vins.

Les preuves de la tradition multi-millénaire de la culture de la vigne et de la production de vins en Roumanie sont exposées ainsi que les efforts actuels réalisés pour promouvoir la qualité.

Mots clés : *Vins de Roumanie — Vignobles — Régions délimitées — Types de vins.*

La Roumanie, située sur les bords de la Mer Noire dans le territoire, bordé par le Danube, de l'ancienne Dacie et traversée en son milieu par le 45e parallèle de latitude Nord et par le 25e méridien à l'Est de Greenwich, présente toutes les formes de relief; celui-ci est dominé par la chaîne des Carpathes qui enserre, au centre, le plateau de la Transylvanie.

En 1975, la superficie totale du vignoble roumain était de 330 624 ha dont 266 318 plantés en raisins de cuve. La moitié de ceux-ci — exactement 139 800 ha — appartient à des régions délimitées et constitue la base de la production de vins blancs et rouges de qualité; ces régions sont situées presque exclusivement sur les versants de la zone des collines, peu fertiles; la moitié de ce vignoble doit être enterrée pendant l'hiver. 90 p. 100 environ de la production de vin (environ 8,5 millions d'hl en 1975) sont destinés à la consommation intérieure, soit 33 l par habitant et par an.

Les régions délimitées s'étendant de la latitude 44,5° (Segarcea) jusqu'à 47°21 (Cotnari) fournissent des vins de qualité.

Dans ces régions, on trouve les zones suivantes :

— La zone subcarpathique méridionale y compris la courbure de la chaîne des Carpathes vers le nord, sur le plateau gétique (Severin-Drîncea-Orevita, Tîrgul Jiu, Craiova-Banul Mărăcine, Segarcea, Drăgăsani-Sîmburesti, Stefânesti Arges, Dealul Mare-Valea Călugărească-Pietroasa) ainsi que sur les plateaux de Dobrogea entre le Danube et la Mer Noire (Murfatlar, Sarica-Niculitel, Babadag).

— La zone des collines à l'est des Carpathes orientaux : essentiellement le plateau de Moldavie (Cotesti, Odobesti, Panciu, Nicoresti, Dealul Bujorului, Dealurile Tutovei, Husi, Iasi-Copou-Bucium, Cotnari).

— La zone située à l'intérieur de l'arc carpathique : plateau de Transylvanie (Alba Iulia, Tîrnave-Blaj-Jidvei-Medias Aiud, Lechinta-Teaca).

— Les zones des collines qui entourent au nord et à l'ouest le plateau de Transylvanie et les Carpathes occidentaux (Halmeu, Seini, Diosig, Valea lui Mihai, Simleul Silvaniei, Minis, Teremia, Recas, Buzias, Silagiu, Tirol).

Dans la plupart des régions viticoles, la vigne est située sur les versants des collines et des vallées et, pour une faible part, sur les plateaux; les expositions sont bonnes (Sud, Sud-Est, Sud-Ouest et Ouest) et comportent divers voisinages favorables : hautes collines, forêts, cours d'eau, lacs, etc.. Les principaux types de sols sont les suivants :

— sols brun-rougeâtres de forêt, faiblement lessivés : Severin-Drîncea, Craiova, Dragăsani-Sîmburesti, Dealul Mare-Valea Călugărească-Urlati-Tohani, Dealul Bujor, Nicoresti, Simleul Silvaniei, Buzias, Silagiu;

— sols bruns, lessivés : Tîrgul Jiu, Drăgăsani, Stefănesti Arges, Dealul Mare-Valea Călugărească, Tîrnave, Alba Iulia, Aiud, Simleul Silvaniei, Buzias, Recas, Silogiu, Panciu, Dealurile Tutovei;

— chernozems à horizon B argillique : Segarcea, Cotnari, Iasi, Husi, Panciu, Odobesti;

— rendzines Murfatlar, Sarica-Niculitel, Recas;

— chernozems à horizon B cambique ou argillique : Alba Iulia, Aiud, Tîrgul Jiu, Segarcea, Dealul Mare;

— chernozems à horizon B cambique : Iasi-Uricani, Odobesti, Dealul Tutovei, Dealul Bujor;

— sols gris forestiers et sols bruns lessivés : Husi, Dealurile Tutovei, Cotesti.

Le climat de Roumanie, de type tempéré continental avec des écarts plus importants au sud et à l'est du pays, est dominé par 3 zones d'influence atmosphérique : l'anti-cyclone de Sibérie, l'anti-cyclone des Açores et la dépression de la Méditerranée; ce climat reste, d'autre part, sous l'influence des caractères propres au relief (par exemple de la chaîne des Carpathes et de la Mer Noire).

Dans l'ensemble, le climat général de la majorité des régions viticoles roumaines possède une température moyenne annuelle de 9 à 11,5 °C; celle-ci diminue légèrement au nord de la Transylvanie (9 °C). Calculées sur une période de 60 ans (de

1896 à 1955), les moyennes montrent que, dans toutes les régions viticoles situées dans le sud du pays, la température maximale absolue ne dépasse pas, en été, 40 °C; sur la même période, les minima absolus peuvent atteindre — 20 à — 25 °C, très rarement — 30 à — 34 °C. C'est pourquoi, en hiver, la moitié de la superficie des vignobles délimités doit être enterrée. Malgré ces conditions hivernales sévères, le reste de l'année offre des conditions plus douces, favorables à une très bonne maturation des raisins tandis que les automnes sont généralement longs et secs. La hauteur annuelle des précipitations (valeur moyenne de 1895 à 1955) varie entre 369 mm à Murfatlar et 680 mm à Lechinita, la durée d'insolation (valeur moyenne de 1956 à 1965) de 1 195 (Iassy) à 2 282 h (Constantza).

Malgré des hivers pareillement rigoureux divers botanistes étrangers (Pax, 1908) ou roumains (Pop, 1931; Grintescu, 1959) ont signalé la présence de vigne sauvage (*Vitis silvestris* Gmel) en plus de 200 endroits abrités; cette espèce est, en Europe, la seule restante au sud des Alpes, des Carpathes et du Caucase, rescapée de la dernière époque glaciaire; elle est considérée comme l'espèce parente des cépages cultivés actuels (Teodorescu *et al.*, 1966).

Afin de présenter une image exhaustive du climat des vignobles roumains, de leur encépagement ainsi que des types de vins de qualité qui en sont issus, nous avons choisi, parmi les diverses zones géographiques, 23 régions et centres viticoles (tabl. 1).

Comme on le voit, certains cépages sont d'origine locale; d'autres sont originaires de divers pays. Les façons culturales roumaines varient selon les caractères climatiques, imposant le régime *enterré* ou permettant le régime *non enterré*.

En ce qui concerne la pourriture noble, les conditions de son développement sont réunies dans les régions plus froides (Cotnari, Alba Iulia, Lechintza etc...) où les automnes sont longs, secs et ensoleillés, ce que localement on appelle *le petit été*; on la trouve aussi dans les régions plus ensoleillées et plus sèches (Murfatlar) où le champignon se développe également au cours de l'automne pendant une assez courte période.

Grâce à l'existence de conditions favorables de climat et de sol jointes à un encépagement de valeur, il est possible d'obtenir, dans les régions viticoles de Roumanie, tous les types de vins de qualités, blancs et rouges secs, blancs demi-doux et doux, muscats secs, demi-secs et doux, vins mousseux (tabl. 1). La composition sommaire de quelques vins est présentée dans le tableau 2.

Afin de mieux connaître les conditions climatiques des grands millésimes roumains, des recherches ont été menées, pour 4 cépages, dans 10 régions et centres (Tirgul Jiu, Dragasani, Stefanesti Arges, Dealul Mare-Valea Călugăreasca, Dealul-Mare-Pietroasa, Murfatlar, Odobesti, Iasi, Tirnave-Blaji, Minis) sur la qualité de la maturation des raisins et sur celle des vins obtenus au cours des 10 dernières années (de 1966 à 1975).

Pour chaque région, on classe chaque année comme *grande année, très bonne, bonne, satisfaisante, médiocre* et *mauvaise*. Pour chaque région et chaque cépage, les conditions climatiques (T, I, P) de chaque année sont classées en ordre croissant en fonction de la qualité de la maturation des raisins et de celle des vins.

La synthèse des résultats obtenus (tabl. 3) montre que lors des années classées comme *grandes* et *très bonnes*, ni les températures ni l'insolation ne sont plus importantes; on constate, par contre, une nette diminution des précipitations; de même, les années classées comme *mauvaises* se différencient des années *normales* par un surplus de précipitations (surtout si ce surplus survient après le 1er août) et, dans une moindre mesure par l'insuffisance de la température ou de l'insolation.

Ces conclusions sur l'influence néfaste des pluies confirment en même temps

TABLEAU I

Renseignements divers sur quelques régions viticoles de Roumanie

Région ou Centre Viticole	L	Moyenne des années 1966 à 1975				Cépages	Pourriture Noble fréquente	Types de vins élaborés
		Ta (° C)	Avril-septembre inclus					
			T	I	P			
Severin-Drincea . . .	44°38'	10,0	3 490	1 547	397	Cabernet-Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Sauvignon, Tamîioasa.	—	rs, bs
Tîrgul Jiu	45°02'	10,2	3 325	1 378	537	Riesling italien, Pinot gris, Feteasca alba, Muscat Ottonel, Cabernet-Sauvignon.	—	Bs, rs
Craiova-Banul Maracine	44°19'	9,7	3 364	1 542	296	Cabernet-Sauvignon, Pinot noir, Merlot, Sauvignon, Riesling italien.	—	rs, bs
Segarcea	44°05'	10,3	3 409	1 524	259	Pinot noir, Cabernet-Sauvignon, Tamîioasa, Sauvignon.	—	rs, bs
Dragaşani-Sîmburesti	44°39'	10,4	3 664	1 601	543	Crîmpoşie, Tamîioasa, Sauvignon, Pinot noir, Merlot, Cabernet-Sauvignon.	oui	bs, rs mt, bd
Ştefaneşti-Argeş . . .	44°51'	9,8	3 120	1 481	531	Feteasca alba, Feteasca regala Sauvignon, Pinot gris, Tamîioasa.	oui	bs, bd mt
Dealul Mare-Valea-Calugareasca . . .	44°58'	10,6	3 691	1 607	487	Cabernet-Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Feteasca alba, Pinot gris, Muscat Ottonel.	—	rs, bs
Dealul Mare-Pietroasa	45°03'	10,6	3 697	1 601	469	Grasa, Tamîioasa, Feteasca alba, Riesling italien, Cabernet-Sauvignon.	oui	bd, mt bs, rs

Murfatlar	44°11'	11,0	3 303	1 807	291	Chardonnay, Pinot gris, Pinot noir, Cabernet-Sauvignon.	oui	bd, rs
Sarica-Niculitel . . .	44°41'	10,0	3 141	1 612	279	Aligoté, Riesling italien, Sauvignon, Pinot gris, Cabernet-Sauvignon, Pinot noir.	—	bs, rs
Obodeşti	45°46'	10,3	3 264	1 426	439	Galbena Feteasca alba, Riesling italien, Feteasca regala, Merlot	—	bs, rs
Panciu	45°50'	9,5	3 209	1 489	476	Feteasca alba, Feteasca regala, Riesling italien, Babeasca neogrà.	—	bs, mss
Nicorésti	45°56'	10,0	3 228	1 473	349	Babeasca noir, Feteasca noir, Merlot.	—	rs
Dealul Bujor	46°05'	9,9	3 206	1 483	356	Muscat Ottonel, Feteasca alba, Riesling italien, Merlot.	—	bs, rs
Dealul Tutova . . .	46°15'	9,9	3 146	1 593	325	Feteasca alba, Feteasca neagra Merlot, Cabernet-Sauvignon.	—	bs, rs
Huşi	46°41'	9,8	3 223	1 514	321	Zghihara, Feteasca blanc, Aligoté Busuioaca, Merlot, Cabernet-Sauvignon.	oui	bs, bd rs
Iaşi-Copou-Bucium .	47°10'	9,6	3 128	1 485	421	Aligoté, Feteasca alba, Feteasca regala, Feteasca noir, Cabernet-Sauvignon.	—	bs, rs mss
Cotnari	47°21'	9,0	3 036	1 463	301	Grasa, Feteasca alba, Frincuse, Busuioaca.	oui	bd
Tîrnave-Blaj-Jidvei .	46°11'	9,2	3 050	1 292	477	Traminer rosé, Muscat Ottonel, Feteasca alba, Pinot gris, Riesling italien.	oui	bs, bd mt, mss
Alba-Iulia	46°04'	9,5	3 035	1 348	364	Feteasca alba, Pinot gris, Sauvignon, Muscat Ottonel.	oui	bs, bd mt, mss
Lechinţa	47°10'	8,6	2 856	1 269	508	Feteasca blanc, Sauvignon, Pinot gris.	oui	bs, bd
Şimleul-Silvaniei. . .	47°11'	9,8	2 985	1 329	459	Feteasca regala, Feteasca alba, Neuburger, Pinot gris, Riesling italien.	—	mss
Miniş.	46°08'	11,2	3 622	1 614	441	Cadarca, Cabernet-Sauvignon, Mustoasa.	—	rs, bs

L : Latitude Nord; Ta : Température moyenne annuelle; T : Somme des températures; I : Durée d'insolation; P : Hauteur des pluies; bs : Blanc sec; bd : Blanc demi-sec ou doux; rs : Rouge sec; mt : Muscat; mss : Mousseux.

TABLEAU 2

Composition sommaire de quelques vins roumains de qualité (rouges et blancs)

Région ou Centre viticole	Cépage	Millésime	Degré alcoolique acquis (°GL)	Acidité totale (g H^2SO_4 /l)	Acidité volatile (g HS_3O_1 /l	Sucres résiduels (g /l)	Glycérol (g /l)	Extrait sec réduit (g /l)	Cendres (g /l)	Alcalinité des cendres (g K_2CO_2 /l)	Azote total (mg /l)
Odobești-Șarba	Galbena	1970	10,71	5,88	0,48	1,34	7,60	18,48	1,41	1,30	284
Huși	Zghihara	1972	11,16	4,66	0,37	1,00	8,60	21,70	2,08	1,56	—
Iași-Copou	Aligoté	1966	13,20	4,27	0,52	1,50	10,92	24,56	2,09	1,62	527
Lechința	Pinot gris	1973	13,80	5,43	0,63	1,0	8,28	23,64	1,48	1,15	384
Tîrnave-Jidvei	Traminer rose	1973	13,20	4,50	0,65	1,0	8,74	25,06	2,20	1,43	588
Tîrnave-Blaj	Muscat Ottonel	1973	12,10	4,47	0,47	35,7	11,5	33,00	2,07	1,18	413
Alba Iulia-Țelna	Feteasca alba	1973	11,30	5,71	0,63	72,2	12,40	35,00	3,06	1,58	423
Ștefanești-Argeș	Sauvignon	1966	12,25	4,28	0,47	34,0	10,13	27,80	2,25	1,67	—
Dragașani	Tamîioasa	1966	12,80	4,31	0,39	54,0	9,48	26,14	2,42	1,24	308
Murfatlar	Chardonnay	1973	11,70	4,71	0,52	84,50	8,44	26,20	2,06	1,44	—
Pietroasa	Tamîioasa	1974	11,60	4,67	0,46	50,80	14,97	28,54	2,41	1,83	645
Cotnari-Naslau	Grasa	1973	12,50	6,21	0,41	81,20	10,25	32,83	2,67	2,00	476
Nicorești	Babeasca neagrà	1975	11,80	5,18	0,44	1,90	9,20	22,96	2,30	1,98	258
Severin-Drîncea	Cabernet-Sauvignon	1974	13,30	4,32	0,42	1,0	9,7	28,30	3,30	2,60	308
Segarcea	Pinot noir	1974	13,80	4,21	0,62	4,21	13,26	28,00	2,54	1,88	326
Sîmburești	Merlot	1975	14,30	3,72	0,62	2,21	8,74	26,21	2,48	1,71	387
Miniș	Cabernet-Sauvignon	1971	13,00	4,41	0,54	1,44	10,35	27,30	2,26	1,17	368
Valea Calugareasca	Cabernet-Sauvignon	1973	12,50	3,96	0,47	1,72	14,08	33,96	2,86	1,75	340

TABLEAU 3

Caractéristiques climatiques des grands et petits millésimes dans diverses régions viticoles de Roumanie (pour chaque région et chaque cépage, les conditions climatiques T, I, P des millésimes sont classées dans un ordre croissant de la qualité de la maturation des raisins et de celle des vins).

Dans la même région, par comparaison avec les années normales, on voit que

	Les grands et bons millésimes (*) présentent :	Les médiocres et mauvaises années présentent :
T	plus de 0 à 4,5 p. 100 (jusqu'à 7 p. 100 dans les régions froides).	moins de 0 à 6,5 p. 100
I	plus de 0 à 7 p. 100 (jusqu'à 8,5 p. 100 dans les régions froides)	moins de 3 à 9 p. 100
P	moins de 8 à 10 p. 100 (**) (jusqu'à 25 à 30 p. 100)	plus de 10 à 30 p. 100

T : somme des températures; I : durée d'insolation; P : hauteur des précipitations du mois d'avril au mois de septembre inclus.
(*) On a, dans ce cas, une véraison précoce et une teneur supérieure en sucres.
(**) Surtout après le 1er août.

qu'il existe une relation étroite entre la qualité des millésimes et l'augmentation de la valeur de la différence : « Somme des températures — (moins), hauteur des pluies », relation observée par PEYNAUD (1971).

Dans de nombreuses régions viticoles roumaines et tout d'abord dans les régions froides (Tirnave-Blaj), Stefanesti-Arges etc...). Si la valeur de cette différence est supérieure à 2 800, on a, comme dans la région de Bordeaux, de bonnes années; dans des régions plus chaudes comme celles de Pietroasa, de Dragasani etc... la valeur de la différence doit atteindre 2 900 à 3 000.

On produit en Roumanie d'excellents vins rouges, exception faite de la Transylvanie où n'existent pas de cépages convenables; les régions productrices de ces types de vins sont nombreuses; cependant, dans certaines, la qualité et surtout l'intensité de la couleur peuvent se révéler différentes d'une année à l'autre. Sachant que la synthèse des anthocyanes, dans le raisin, est plus sensible aux conditions climatiques que la synthèse des substances constitutives de l'arôme, nous avons essayé de préciser les meilleures conditions climatiques pour l'obtention des vins rouges de qualité; cette étude a été réalisée dans 23 régions viticoles représentatives de l'ensemble des diverses zones géographiques roumaines; le paramètre retenu a été, non pas l'intensité colorante des vins, variable selon la technique de vinification utilisée, mais la quantité de matière colorante des raisins d'un même cépage déterminée pendant plusieurs années dans chacune des régions (MIHALCA, 1976).

Si aux valeurs des températures on ajoute celles de l'insolation (favorables à la synthèse des anthocyanes) et si l'on tient compte de la correction due à la diminution de l'excès de pluie (défavorable à la qualité) on peut exprimer, dans certaines limites, le caractère favorable, c'est-à-dire l'aptitude climatique de quelques régions viticoles à produire de grands vins rouges par la relation : $F = T + I - (P - 250)$, dans laquelle T, I, P représentent les moyennes sur un grand nom-

TABLEAU 4

Aptitudes climatiques à la production de grands vins rouges dans quelques régions viticoles de Roumanie

Région ou Centre Viticole	Altitude moyenne (m)	Nombre de jours très chauds (30 à 40 °C)	Valeur de l'aptitude climatique F	Aptitude à la synthèse des anthocyanes (*)
Lechinta	317	5	3 867	
Şimleul Silvaniei	294	8	4 105	
Tîrnave-Blaj	248	15	4 114	I
Alba Iulia	248	24	4 265	
Ştefaneşti-Argeş	307	14	4 320	
Tîrgul Jiu	222	20	4 416	II
Iaşi	100	12	4 442	750 (moy. (**) sur 5 ans)
Cotnari	360	14	4 448	
Panciu	269	15	4 472	
Odobeşti	150	15	4 539	820 (moy. sur 8 ans)
Nicoreşti	125	19	4 602	
Dealurile Tutovei	174	15	4 664	
Huşi	102	23	4 666	
Dealul Bujor	126	20	4 678	
Sarica-Niculiţel	211	21	4 725	
Craiova	105	49	4 860	III
Severin-Drîncea	70	40	4 890	(**)
Segarcea	145	53	4 924	
Dragaşani-Sîmbureşti	182	26	4 972	870 (moyenne sur 14 ans)
Murfatlar	32	26	5 069	1 235 (moyenne sur 9 ans
Miniş	125	38	5 045	1 325 (moyenne) sur 11 ans)
Dealul Mare-Valea Călugă reasca		17	5 061	1 260 (moyenne sur 14 ans)
Dealul Mare-Pietroasa	150	18	5 079	

(*) I *Régions à aptitudes faibles:* Pas de culture de cépages de cuve rouges.
II *Régions à aptitudes moyennes* (la synthèse des anthocyanes reste très dépendante des conditions climatiques de l'année) : la culture des cépages blancs est prédominante.
(**) III *Régions à fortes aptitudes* : Les chiffres représentent, pour la région considérée, la teneur moyenne en anthocyanes des raisins (Cabernet-Sauvignon) exprimée en mg/kg.

bre d'années, d'avril à septembre inclus, de la somme des températures, de la durée de l'insolation, de la hauteur des pluies.

On observe dans le tableau 4 qu'à des valeurs croissantes de F correspondent des valeurs croissantes de la quantité de matière colorante, accumulée dans le raisin. De même, les vins rouges de ces crus sont de plus en plus riches et généreux.

La relation n'est pas valable pour toutes les régions car une trop grande chaleur et une trop grande insolation, même si elles favorisent la formation des anthocyanes, sont nuisibles à la qualité.

Comme pour les vins blancs, les vins rouges de qualité sont produits en Roumanie uniquement à l'intérieur de l'aire délimitée dont proviennent les raisins et dont ils portent le nom. La tradition est celle de la vinification par mélange des cépages spécifiques de chaque région. Cependant, récemment, les exigences du commerce imposent de produire des vins dont l'appellation doit porter outre le nom de la région, celui du cépage.

En Roumanie, les caves sont de grande capacité et l'on accorde une attention particulière aux méthodes de travail qui empêchent la vinification de tourner à l'industrie aveugle. Les vins rouges sont élaborés, après éraflage des raisins, par vinification en rouge dans des cuves de bois ou de béton. On préfère utiliser, actuellement, des batteries de cuves tournantes en acier inoxydable (200 hl) qui, par rapport aux autres appareillages, assurent pendant la fermentation alcoolique une extraction optimale de la couleur grâce au mouvement rotatif qui permet un très bon contact entre le jus et les pellicules; l'usage de ce type de matériel permet en même temps une facile régulation de la température de fermentation ainsi qu'un décuvage mécanisé rapide et aisé.

La défense et la promotion de la qualité des vins passe tout d'abord par une meilleure harmonie entre facteurs viticoles agrotechniques et facteurs pédoclimatiques. En ce sens, on observe dans certaines régions viticoles que le nombre de bons millésimes augmente parallèlement à la densité de plantation et à la diminution du rendement par cep (Oprean, 1975). Aujourd'hui, en Roumanie, on assiste à une augmentation de la densité de plantation, l'écartement minimal indispensable à la mécanisation des façons culturales étant compensé par un nombre supérieur de plants par rang.

Le respect de la qualité passe également par celui de la tradition. Le peuple roumain est particulièrement fier de l'ancienneté de sa tradition viticole et œnologique. Des preuves nombreuses, historiques, archéologiques, linguistiques, attestent de façon certaine que les Thraces des Balkans et du Nord du Danube — dont nos ancêtres, les Géto-Daces constituaient un rameau — cultivaient la vigne et connaissaient le vin 4 000 ans au moins avant notre ère (Teodorescu *et al.*, 1966).

En suivant les chemins parcourus par la culture de la vigne et par l'art de la vinification Billard (1913) a montré que la propagation s'est faite par conquêtes successives des pays suivants : Asie, Thrace, Grèce et Italie; le rayonnement à partir de ces pays s'est ensuite étendu à d'autres.

En Thrace, pays célèbre par ses vins, le culte de Dyonisos connaissait la plus grande faveur. Selon Homère, dans son Odyssée, l'arrivée de vaisseaux chargés de vins destinés aux troupes grecques assiégeant Troie, était quotidienne; toujours selon la même source c'est de Maron, prêtre d'Appolon de Iamaria, que provenait la boisson magique avec laquelle le cyclope Polyphème se trouva enivré; il ne pouvait s'agir de vins provenant de comptoirs grecs des bords de la mer Noire, étant donné que la cité conquise par les Achéens, après 10 ans de siège selon la légende, ne peut être que Troie VII (niveau correspondant à la fin de l'existence de la cité entre — 1 500 et — 1 184); or, la colonisation des rivages méditerranéens par l'expansion grecque ne commence pas avant le VIIIe siècle avant notre ère (Bassermann, 1923) Jordan confirme également l'existence du culte dyonisiaque en Thrace, à l'âge du bronze (— 2 000).

Les conditions de climat et de sol favorables à la qualité, le grand nombre de cépages locaux cultivés, dans chaque région, selon des méthodes convenables,

le mode de vinification considéré comme étant le meilleur, à la fois par expérience et par tradition, font tout naturellement que l'actuel territoire de Roumanie pouvait produire, autrefois comme aujourd'hui, tous les types de vins de qualité qui donnaient aux hommes toute satisfaction en récompense de leur travail. Les nombreuses fêtes, chansons, coutumes, les nombreux jeux, qui persistent encore aujourd'hui en Roumanie sont autant de preuves qui rappellent et honorent les grands moments de l'activité viticole et œnologique et chantent les louanges du vin.

Le peuple roumain n'a jamais abandonné la vigne, pas même pendant les invasions barbares au cours desquelles, pendant des millénaires, la survie n'était possible que dans les montagnes difficilement accessibles. Même aujourd'hui, la tradition s'est maintenue de cultiver la vigne dans de hautes régions montagneuses abritées. Ceci explique que les vignobles roumains actuels soient situés presque uniquement sur des collines, les zones pré-montagneuses présentant même, aujourd'hui, la plus grande densité de population.

Pendant les périodes de paix les vins roumains étaient le principal produit d'exportation vers la Pologne, la Russie, la Transylvanie et l'Autriche-Hongrie. La fraîcheur et le fruité des vins blancs, d'Odobesti et de Panciu par exemple attiraient depuis des siècles les commerçants cosaques qui les achetaient dès les vendanges et attendaient sur place la fin de la fermentation pour les transporter en traîneaux, dans les premières neiges de l'hiver, jusqu'aux rives du Dniepr et du Don.

On constate aujourd'hui que les efforts réalisés par la Roumanie pour la défense de la qualité de ses vins sont nombreux et variés. Les premiers travaux œnologiques réalisés vers la fin du siècle dernier à la Station Agronomique de Bucarest avaient pour but l'établissement de critères analytiques pour s'assurer du caractère naturel des vins. Dans leurs travaux, MUNTEANU et ROMAN (1 900) et SUMULEANU (1 911) se proposaient de « rechercher les qualités à développer et les défauts à corriger des vins de Roumanie et de pouvoir distinguer, du point de vue analytique, un vin naturel d'un vin falsifié ». COLTESCU et son école (1929) s'astreignent à des efforts longs et importants pour compléter et assurer la maintenance d'un casier annuel des vins roumains.

Pour améliorer les conditions de vinification NITESCU (1915), dans les laboratoires de fermentation de l'Institut Pasteur de Paris et sous la direction du professeur FERNBACH, réalise une étude minutieuse sur la sélection des levures des principaux crus de Roumanie.

On étudie et on précise également la répartition géographique par groupes naturels des vignobles roumains (TEODORESCU, 1929, 1937); en ce qui concerne les cépages, on s'attache à les tester, malgré un grand choix local en partie étudié (NICOLEANU, 1900); on a ainsi accepté 17 cépages étrangers, rouges et blancs sur un total de 32 prévus.

En complément des lois antérieures sur la répression des fraudes dans le commerce du vin (de 1915 et de 1926) et comme premier pays à suivre l'exemple français, la Roumanie élabore la loi sur la Défense de la Viticulture (1936); celle-ci donne le droit à l'appellation d'origine pour les vins traditionnellement élaborés dans des régions délimitées. Cette loi, actualisée et approfondie par la nouvelle loi sur la vigne et le vin (1971) et par les Normes Techniques de son application (1972) instaure, en outre, la catégorie des vins supérieurs à appellation d'origine contrôlée ainsi que des grades de qualité, classant les cépages en *recommandés* et *autorisés*.

On pourrait trouver encore d'autres exemples car, en Roumanie, l'amour

et le respect de la qualité de la vigne et du vin ont toujours été très vifs; dans notre pays, la viticulture ne représente pas seulement une création des hommes comme l'a si bien écrit DION (1959) pour la France. Pour le peuple roumain, la vigne, dont il doit plus que d'autres prendre soin à cause de la rigueur du climat, n'a pas seulement pour signification celle d'une plante cultivée économiquement importante — mais, amie de sa vie, elle l'a suivie fidèlement tout au long des siècles nombreux et obscurs de son histoire agitée, elle a été le symbole vivant, qui lui a donné confiance, selon lequel l'enterrement d'automne débouche toujours pour lui aussi sur les beaux jours du printemps à venir.

Summary

The rumanian vineyards and wines

Situated beside the Black sea, north of the Danube and traversed by both latitude 45° north and longitude 25° east of Grennwich in the centre, Romania presents all types of reliefs dominated by the Carpathian mountain range. In 1975 the total area of cultivated vines was 330 642 ha; of these 139 000 ha were planted with high quality wine grape varieties in specific regions of the foot hills. The vines are half covered with earth during winter. The geographical distribution of the principle viticultural regions, the characteristics of the climate and soils and the different grape varieties grown are described.

Due tot the favourable conditions found in Romania; all types of quality wines are produced; dry whites and reds, semi-dry and sweet whites, muscats and sparkling wines. A summary of the composition of certain samples is presented. A climatic and œnological study of the cultivated grape varieties in 10 regions during 10 years indicates that the best wines were made from grapes grown in high temperature and sunlight conditions and receiving a low rainfall from April to September.

In attempting to define the climatic conditions in the various viticultural regions necesary for quality red wine production, the criteria of quality chosen was the quantity of colour pigment in the grape. If one relates the sum of the temperatures from April to September (T), the insolation (I) and the precipitation (P) in the relationship $F = T + I - (P - 250)$ regions with a value less than 43 000 can be considered as having unfavourable climatic conditions, regions with a value from 4 300 to 4 600 as having limiting climatic conditions, and regions with a value above this (4 600-5 100) are considered as presenting favourable climatic conditions to viticulture. The validity of this relationship is limited in the case of very high values since above a certain threshold, excess heat and sunlight become detrimental to wine quality.

Evidence of the success of the several thousand year old tradition of viticulture and wine production in Romania is presented, as are the present aims for improving quality.

Key-words: *Rumanian wines — Vineyards — Delimited areas — Wine types.*

Références bibliographiques

BASSERMAN J. F., 1923. *Geschichte des Weinbaues*, Frankfurt a.M.

BILLARD R., 1913. *La vigne dans l'antiquité*, Lyon.

COLTESCU I. H., GONTA J., NICHITOVICI V., BOSSEL L., TOMESCU F., 1929. *Studiul compozitei vinurilor din Rômania*, Minst. Agr. Bucarest.

DION R., 1959. *Histoire de la vigne et du vin en France des origines au XIXe siècle*, Imp. Sévin et C°, Doullens.

GRINTESCU I., 1966. *Flora R.S. Rom.*, vol. VI, éd. Acad. Bucarest.

MIHALCA A., 1976. *C.R. Colloque franco-roumain sur les méthodes de vinification en rouge*, Stefanesti, Arges.

MUNTEANU C., ROMAN C., 1900. *Vinurile Rômaniei*, Eminescu éd., Bucarest.

NICOLEANU G., 1900. *Introduction à l'ampélographie roumaine*, Bucarest.

NITESCU M. A., 1915. *Contribution à l'étude des levures roumaines*, Thèse Doctorat ès Sciences, Paris.

OPREAN M., 1975. *Viticulture générale*, éd. Didactica si Pedag., Bucarest.

PAX F., 1908. *Grünzüge der Planzenvorbreitung in der Karpaten Végétation d. Erde*, Tome II, 10.

PEYNAUD E., 1971. *Connaissance et travail du vin*, Dunod éd., Paris.

POP E., 1931. Bull. Grad. Bot., *Cluj*, *XI*, 3-4.

SUMULEANU C., 1911. *Studiul vinurilor din Rômania*, C. Göbl. éd., Bucarest.

TEODORESCU I. C., 1929. Bull. Intern. du Vin, **19**.

TEODORESCU I. C., 1937. Inventaire de la production des vins d'appellation d'origine contrôlée en Roumanie, *Congrès Intern. Viticult.*, Libr. Univ. J. Gambe, Paris.

TEODORESCU I. C., TEODORESCU S. C., MIHALCA Gh., 1966. *Vita de vie si vinul de alungul veacurilor*, Agr. Silv. éd., Bucarest.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 53-54.

INTERVENTION

Teneur en oligoéléments des vins roumains en relation avec les zones écologiques

D. DAVIDESCU
Faculté d'Agriculture de Bucarest (Roumanie)

La valeur alimentaire du vin est donnée entre autres qualités par le fait qu'il contient de nombreux éléments métalliques en quantité infime, dont la plupart constituent la partie prosthétique des enzymes ou sont des éléments qui stimulent l'activité des enzymes. Or, la forme chimique sous laquelle les divers éléments métalliques pénètrent dans l'organisme humain a une importance biologique particulière. La teneur des vins en microéléments varie beaucoup de 10^{-12} à 10^{-5} par rapport au cépage et aux conditions du milieu.

Nous avons utilisé pour la détermination des microéléments une variante de la méthode spectrographique mise au point par PAVLOVSCHI. Cette méthode offre la possibilité de caractériser les teneurs en Mn, Sr, Zn, Cr, Mo, Pb, Sn, Co, Ni, Ti, Be, V. Pour les autres microéléments se trouvant en quantités infimes, cette méthode permet de déceler leur limite inférieure. Pour le dosage des quantités infimes de microéléments, on a appliqué le procédé classique de séparation des groupes analytiques par extraction fractionnée et on a procédé à la détermination spectrographique.

Nous avons analysé les vins des vignobles de Drăgăsani, Valea Călugărească et Murfatlar. La somme des températures pendant la période de végétation a été de 3 448 °C à Drăgăsani, 3 446 °C à Valea Călugărească et 3 619 °C à Murfatlar. Le coefficient hygrothermique a été 1,2 à Drăgăsani, 1,1 à Valea Călugărească et 0,5 à Murfatlar. L'indice héliothermique a été 1 300 °C à Drăgăsani, 1 360 C° à Valea Călugărească et 1 633 °C à Murfatlar. Le sol à Drăgăsani est brun limoneux, à Valea Călugărească brun rougeâtre et à Murfatlar tchernozem.

Des données du tableau 1 il résulte que la teneur en microéléments, qui varie par rapport au cépage, est influencée par les conditions écologiques et la technologie de vinification. Le cépage Merlot présente une teneur plus élevée en Mn, Sr, Zn, Cr, Sn à Drăgăsani, que le même cépage cultivé à Valea Călugărească et Murfatlar. La teneur en Mn, Sr, Zn, Pb du cépage Cabernet Sauvignon cultivé à Murfatlar a été plus élevée que celle du même cépage cultivé à Valea Călugărească. La teneur en Mn du cépage Riesling, autant à Drăgăsani qu'à Valea Călugărească, a été plus faible que celle des cépages de vin rouge.

Lorsqu'on considère la teneur en microéléments des vins il faut prendre en considération le fait que pendant une conservation prolongée, une partie des microéléments passe dans les produits qui sédimentent.

L'utilisation du vin comme médicament naturel, trouve ainsi une confirmation par la présence des divers microéléments qui participent à un grand nombre de processus enzymatiques.

TABLEAU I

Teneur en microéléments de quelques cépages de raisins de cru dans trois vignobles de Roumanie

Cépage	En microgrammes par litre de moût									
	Mn	Sr	Zn	Sn	Cr	Mo	Pb	V	Be	Ti
					Drăgășani					
Merlot	328	791	920	12	27	1	1	0,3	0,2	0,2
Fetească regală	292	775	690	10	31,5	1	3	0,2	0,3	0,4
Riesling	160	535	130	5	14	1	2	0,7	0,4	0,6
					Valea Călugărească					
Merlot	159	505	135	5	8,2	2	2	0,4	0,2	0,5
Cabernet Sauvignon	166—	518	140	10	15,3	3	4	0,5	0,5	0,3
Fetească regală	116	565	170	10	4,5	3	3	0,5	0,5	0,3
Riesling	93	525	130	12	4,2	2	2	0,3	0,2	0,5
					Murfatlar					
Merlot	250	124	275				60			
Cabernet Sauvignon	232	190	720				24			
Fetească regală	240	195	400				55			
Pinot noir	122	142	283				60			

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 55-67.

Les conditions de développement du vignoble de la Rioja (Espagne)

A. HUETZ de LEMPS

Institut de Géographie et d'Études Régionales
Université de Bordeaux III (France)

Résumé

Le vignoble de la Rioja (42 000 ha) produit les vins de table les plus appréciés de toute l'Espagne. Le climat, bien arrosé au printemps, modérément chaud en été, très ensoleillé jusqu'à la vendange, s'est révélé favorable à l'élaboration de vins de qualité. Pourtant, jusqu'au milieu du XIXe siècle, la Rioja ne fournissait que des vins ordinaires. L'adoption des techniques du Bordelais, en particulier, le vieillissement dans des barriques de chêne, ont permis d'obtenir des produits de qualité mais qui conservèrent leur originalité, leur bouquet caractéristique, parce que les viticulteurs eurent la sagesse de garder les cépages traditionnels surtout le tempranillo et le graciano. Les chais de vieillissement (bodegas de crianza) se localisent essentiellement dans la Rioja occidentale (Rioja Alta et Rioja Alavesa); à l'Est en effet, en Basse Rioja, le climat devient plus sec, plus chaud et la variété garnacho tinto donne des vins rouges fortement alcoolisés (13,5 à 16,5°), élaborés par des coopératives et vendus en gros. Une trentaine de « criadorse-exportadores » font vieillir et mettent en bouteilles; certains possèdent des domaines qui fournissent une bonne partie des vins les plus prestigieux de la Rioja. De puissantes Sociétés se sont récemment implantées dans la Rioja et ont construit des chais très modernes de grande capacité et pratiquent la mise en bouteilles sur une grande échelle. La hiérarchisation des vins produits sous la dénomination « Rioja » a tendance à s'accentuer.

Mots clés : *Vignobles de la Rioja — Géographie — Types de vin — Production.*

Introduction

La région espagnole de la Rioja, située dans le bassin de l'Ebre, fournit un exemple très caractéristique de vignoble produisant des vins de table de qualité grâce à la conjonction de conditions physiques favorables et d'initiatives humaines intelligentes, qui ont permis de valoriser les potentialités du milieu naturel.

La vigne occupe dans la Rioja environ 42 000 ha et la production de vin oscille autour d'un million d'hectolitres. L'appellation d'origine « Rioja », créée dès 1926,

a été définie de façon précise en 1977 et quelques modifications ou compléments ont été apportés en 1970. Les limites de l'appellation englobent une zone très vaste de 137 communes (términos municipales) dont 113 situées dans la province du Logroño, 18 en Alava et 6 en Navarre. Tous les vins élaborés à l'intérieur de ces limites sur des sols reconnus aptes par le « Consejo Regulador » ont le droit de s'appeler « Rioja ». En 1973, par exemple, la récolte s'est élevée à 1 280 000 hl, répartis entre 74,5 p. 100 de vins rouges, 15,5 p. 100 de rosés et 10 p. 100 de blancs. Mais une partie seulement de la production, souvent moins du quart, est vieillie et mise en bouteilles.

En effet, la Rioja n'est pas une région homogène, ni du point de vue des conditions climatiques, ni de celui des sols, et on la divise traditionnellement en trois parties : la Haute Rioja (*Rioja Alta*, 16 000 ha de vignes) située presque entièrement sur la rive droite de l'Ebre jusqu'aux premiers contreforts de la Sierra de la Demanda dans la province de Logroño, la Rioja de l'Alava (*Rioja alavesa*) (7 000 ha) qui s'étend sur la rive gauche de l'Ebre, entre le fleuve et la Sierra de Toleno, dans la province basque d'Alava, et la basse Rioja (*Rioja baja*) qui comporte une mince frange sur la rive gauche, en Navarre (3 700 ha) et surtout de grosses bourgades viticoles au Sud du fleuve, dans la province de Logroño (15 300 ha). Les vins de grande qualité proviennent essentiellement de la Haute Rioja et de la Rioja alavesa car c'est dans la partie occidentale, en amont, que les conditions climatiques sont les plus favorables.

Le climat privilégié de la Rioja occidentale

Le climat de la haute Rioja peut être considéré comme un climat de type méditerranéen mais avec des caractéristiques très atténuées, qui en font un milieu particulièrement favorable à la production de vins de qualité; à Haro, situé à près de 500 m d'altitude la moyenne annuelle des températures est de 12,7°, le total des précipitations est modéré, 500 mm, et le régime pluviométrique est très satisfaisant (fig. 1).

Les températures hivernales peuvent être froides mais les gelées ne sont pas très nombreuses (à Haro, 47 jours par an en moyenne contre 67 à Valladolid) et elles n'atteignent jamais le seuil critique de — 18° (minimum absolu dans la période 1901-30 : — 16° à Logroño); les périodes de froid alternent avec les averses océaniques, mais les quantités de pluie reçues en hiver sont au total assez modestes.

Au printemps, l'accroissement des températures s'accompagne d'une augmentation des précipitations, ce qui favorise le bon démarrage de la végétation; d'après Larrea Redondo et Ruiz Hernandez, 1973 à 1977; Sanchez Gabriel et Fernandez Giro, 1974), il faut que les températures mensuelles de février à juin soient régulièrement ascendantes pour que la récolte donne satisfaction; une inflexion dans la courbe, traduisant une période de refroidissement prolongé au printemps, est inévitablement suivie d'une récolte médiocre.

Le principal danger qui menace le vignoble à cette époque de l'année est constitué par les gelées tardives. Après le passage d'un front froid suivi d'un afflux d'air polaire, le rayonnement nocturne peut faire descendre le thermomètre au-dessous de 0°. Au cours de la période 1901-1950, la fréquence des dates des dernières gelées a été de 16 p. 100 dans la seconde décade d'avril, de 8 p. 100 de la dernière décade d'avril et de 3 p. 100 dans la première décade de mai (Huetz de

LEMPS, 1967). La date moyenne du débourrement est le 12 avril, mais les années froides, celui-ci est retardé jusqu'aux environs du 22 avril (SEGUNDAS JORNADAS TECHNICAS de RIOJA, 1972). Or les gelées n'affectent la région qu'une année sur 10 après le 20 avril. La date la plus redoutée est la Saint-Marc (25 avril) mais les paysans restent dans l'inquiétude jusqu'à la Saint-Grégoire (9 mai) qui peut être aussi un « santo borracho », capable d' « absorber » toute la récolte en une seule nuit. Il faut d'ailleurs souligner que le refroidissement peut être nocif même si les températures enregistrées par les stations météorologiques restent positives car la baisse du thermomètre à la surface même du sol est nettement plus sensible que sous abri. D'ailleurs A. LARREA estime qu'après le 24 avril, toute température

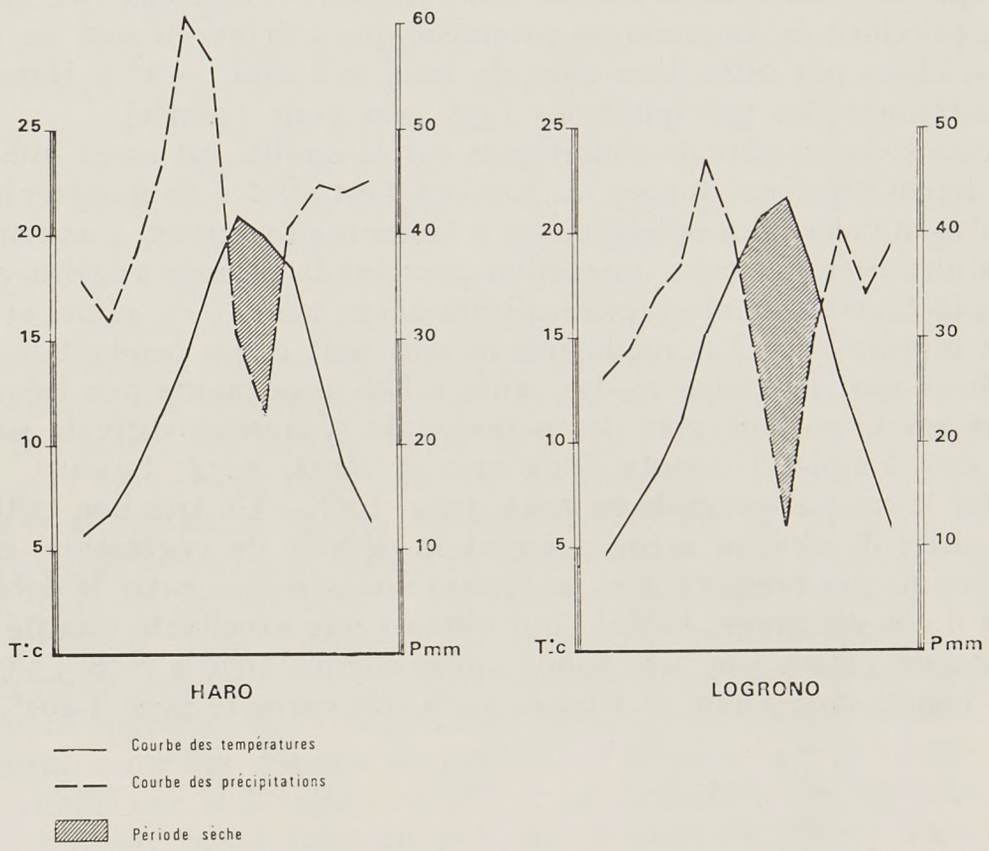


FIG. 1. — *Températures et précipitations dans deux stations de la Rioja.*

inférieure à + 3° peut être considérée comme une gelée au point de vue biologique.

Les gelées printanières affectent beaucoup plus souvent les dépressions et les fonds de vallée que les pentes; au total, leur incidence sur les récoltes n'est pas très importante. Les vignobles de la Rioja sont beaucoup moins menacés que certains vignobles du bassin du Duero.

Un deuxième danger pour le vignoble est constitué par les orages de grêle du printemps ou même de l'été. Mais dans ce domaine également, les destructions sont généralement très localisées et n'abaissent guère le volume global de la récolte. Toute la Rioja n'est pas affectée au même degré; la grêle semble relativement fréquente dans la région de San Asensio. Depuis 1969, une lutte systématique a été entreprise avec l'installation d'un réseau de 446 brûleurs, remplacés en 1974 par 107 puissants « générateurs d'acétone » : ces appareils répandent de l'iodure d'argent qui, par sublimation, empêche la formation de gros grêlons.

L'été est modérément chaud : la moyenne de Haro est de 20,8° en juillet et 20° en août. De plus la sécheresse n'est pas totale : il tombe en moyenne à Haro

30,7 mm d'eau, en juillet et 23 en août. L'humidité relative se maintient à un taux relativement élevé (71,2 p. 100 en juillet et août) et les ceps ne souffrent vraiment de la sécheresse que lorsque souffle pendant plusieurs jours le vent brûlant du Sud-Est, le solano. Cet été, chaud sans être torride, se prolonge par un début d'automne souvent très beau, ce qui permet au raisin de mûrir dans d'excellentes conditions. De plus l'oscillation diurne de la température est assez forte, ce qui accroîtrait les qualités organoleptiques de la récolte. La vendange a lieu au cours du mois d'octobre; les températures modérées de la période de fermentation permettent au vin de garder tout son bouquet.

La production de vin de la Rioja connaît certes des fluctuations selon les années, mais il faut qu'il y ait à la fois des gelées tardives et une sécheresse anormale pour que le volume de la récolte soit vraiment désastreux : ce fut le cas en 1945 où la province de Logroño ne produisit que 270 000 hl soit un rendement moyen de 9 hl/ha par suite d'un coup de froid le 2 mai (— 1° à Haro) et d'une grande insuffisance des précipitations (335 mm pour l'année).

L'influence des variations climatiques sur la qualité est assez difficile à préciser mais depuis plusieurs années, A. LARREA s'est efforcé de montrer les liens qui existent entre la valeur des millésimes et 8 facteurs principaux, 4 annuels (chaleur reçue, total des précipitations, insolation pendant la période végétative, activité solaire) et 4 facteurs saisonniers (gelées printanières, vents secs, pluies et insolation pendant la maturation). Les meilleures années sont celles pendant lesquelles les gelées tardives sont inexistantes, les vents d'Est desséchants peu fréquents l'ensoleillement est important mais les périodes de sécheresse estivale ne sont pas totales ni très longues (LARREA REDONDO et RUIZ, 1974; LARREA REDONDO, 1976). Ce fut le cas par exemple en 1955, 1964, 1968... Un très bon critère semble être la quantité de chaleur reçue pendant la période de végétation, calculée en faisant la somme des températures moyennes quotidiennes entre le débourrement et le début de la vendange; l'idéal pour obtenir une excellente qualité semble se situer autour de 3 600°. Une très bonne année comme 1970 a reçu 3 535°; l'année 1975 a été bonne avec 3 420° et l'année 1976 très correcte avec 3 402°.

L'évolution vers les vins de qualité

Les conditions climatiques que nous venons de rappeler et qui concernent la Haute Rioja et la Rioja Alavesa sont donc incontestablement favorables à la production de vins de qualité. Or jusqu'au milieu du XIXe siècle, ces régions se sont contentées de produire des vins ordinaires.

Le vignoble du bassin de l'Ebre date très probablement de l'époque romaine; des restes d'installations de vinification ont été découverts en plusieurs endroits de la Navarre, à Funes, à Liédena, à Cascante... Après la Reconquête de la Haute Rioja, par les Chrétiens, dès le Xe siècle, la vigne existait dans de nombreux villages, comme le prouvent les chartes de monastères tels que celui de San Millan de la Cogolla. Au XIVe et au XVe siècles, les vins de la Rioja étaient expédiés vers le Nord de l'Alava, vers Vitoria et Salvatierra, et il y eut même à cette époque une véritable bataille commerciale entre Logroño, Laguardia, Haro pour la conquête de ce marché (HUETZ de LEMPS, 1967); au XVIIe, et surtout au XVIIIe siècles, les ventes de vin vers les provinces de la côte cantabrique, Santander, Biscaye, Guipúzcoa, deviennent de plus en plus considérables et profitent surtout aux gros villages de

la Haute Rioja et de la Rioja Alavesa, les plus proches des régions consommatrices, Canicero, Haro, Labastida, Laguardia, San Asensio, San Vicente de la Sonsierra. Par contre Logroño parvient difficilement à écouler ses récoltes parce que les acheteurs, qui organisent de véritables caravanes de mules vers le Pays basque ou des convois de chariots vers la Montaña de Santander, se procurent leur vin avant d'y arriver; quant à la Basse Rioja, encore plus éloignée, elle trouve seulement de modestes débouchés vers les hautes plaines de Soria où elle se heurte à la concurrence des Navarrais et des Aragonais.

Mais ce commerce très actif se fait avec des vins de l'année, des vins de consommation courante destinés aux tavernes des villages et des villes. Il semble qu'au XVIe siècle, il se soit agi principalement de vins blancs mais certains textes distinguent déjà le véritable « blanco » et le « blanco pardillo » un blanc légèrement coloré, et en 1621, on voit apparaître à Vitoria la première mention de « vino clarete de Rioxa », dont le prix est intermédiaire entre le blanc et le rouge moins estimé. Ce clarete devint progressivement le vin le plus apprécié des consommateurs. Mais tous ces vins de la Rioja se conservent difficilement, il faut les vendre avant l'été et les années trop abondantes, une partie de la récolte est perdue.

Or les notables du XVIIIe siècle sont parfaitement au courant des succès obtenus dans le vieillissement des vins en France et le Bordelais va exercer une véritable fascination sur les meilleurs viticulteurs de la Rioja. La première tentative de vieillissement connue est celle d'un propriétaire de Labastida qui, à partir de 1787, s'efforce de produire des vins « estilo de Burdeos » mais il se heurte à l'hostilité des autres producteurs et ne tarde pas à abandonner (Huetz de Lemps, 1970). Nouvel effort vers 1850 : sur les conseils du Duc de la Vitoria, et après un voyage en Bordelais, le Marquis de Murrieta fait vieillir du vin « selon le système Médoc » et expédie quelques caisses de bouteilles en 1852 à Cuba et au Mexique; mais il ne poursuit pas ses efforts. En 1862, l'Assemblée provinciale d'Alava fait venir un Français, Jean Pineau, pour apprendre aux propriétaires de la Rioja Alavesa le vieillissement des vins selon les techniques bordelaises mais ses conseils ne sont guère appréciés de la plupart des producteurs locaux habitués à des rentrées d'argent annuelles. Pineau, remercié par l'Assemblée provinciale, est heureusement accueilli par le Marquis de Riscal, propriétaire d'un domaine à Elciego. Ce dernier n'hésite pas à faire de gros investissements, envoie dans le Bordelais un jeune architecte. Ricardo Bellsolá, qui à son retour construit une « bodega » copiée sur les chais les plus perfectionnés du Médoc, fait fabriquer un millier de « barriques bordelaises » de 228 l et se lance dans la production de vin de qualité. De son côté le Marquis de Murrieta achète en 1870 le domaine d'Ygay, près de Logroño, se remet à faire vieillir ses vins et les deux Marquis sont imités par d'autres grands propriétaires, le Comte de Albay en 1872, Lopez de Heredia et le Marquis de Terán en 1877 etc... En 1885, la production de vins vieillis et mis en bouteilles au bout de 3 ans est estimée à 35 000 hl.

Ainsi, comme en Médoc un siècle auparavant, seuls de grands notables avaient eu les moyens de transformer un vin ordinaire en un vin de qualité en adoptant des techniques coûteuses; les textes du XIXe siècle nous indiquent très clairement en quoi a consisté cette transformation par le « système Médoc » :

— verser le raisin dans des cuves moins vastes qu'auparavant,

— séparer rapidement le raisin de la grappe,

— mettre le vin nouveau dans des récipients nettement plus petits que les tonneaux traditionnels avec l'adoption de la barrique bordelaise en chêne (souvent appelée « bota riojana »),

— aseptiser les barriques avec du soufre,

— installer les barriques dans des chais où les variations de température sont faibles.

— compléter fréquemment le remplissage des barriques par des ouillages,

— pratiquer de fréquents soutirages,

— mettre le vin en bouteilles après clarification.

La période de prospérité qui commence en 1876 et qui est liée à la crise du phylloxéra en France va, en fait, masquer et retarder cette évolution vers la qualité, car pendant plusieurs années, c'est la ruée des négociants, l'installation de chais de coupage près des gares et l'expédition massive des vins de l'année vers la France. Le ralentissement des achats français à partir de 1886, la chute des prix des vins ordinaires amènent ensuite de nombreux négociants soit à quitter la région et à céder leurs affaires, soit à chercher à valoriser le vin sur place. Ils profitent des enseignements donnés par le groupe aristocratique qui s'était déjà tourné vers la qualité. Des capitaux français s'associent à des capitaux locaux ou basques pour créer de nouvelles bodegas dont une partie de la production est destinée au vieillissement. Ainsi sont fondées les bodegas Cune (1879), El Romeral (1881), Ulgalde-Muerza (1882), Gómez Cruzado (1886), Riojanas (1890), Rioja Alta (1890), Palacio (1894), Martínez Lacuesta (1895), Carlos Serres (1896), Paternina (1898), Bilbainas (1901), Franco-Españolas (1890-1901)... Une « Estación Enológica » est créée à Haro en 1892 et joue un rôle essentiel dans l'amélioration des techniques de culture et de vinification. La renommée des vins fins de la Rioja ne cesse de s'affirmer comme le prouvent les médailles gagnées dans toutes les grandes expositions. La bourgeoisie espagnole, en particulier celle du Pays basque, apprécie de plus en plus les vins de la Rioja et le rôle de Bilbao dans les entreprises viticoles de la région ne cesse de s'accroître. L'implantation de ces « bodegas industriales » a évité au début du XXe siècle un effondrement total du vignoble, affecté à la fois par l'arrêt des exportations vers la France et par l'invasion du phylloxéra.

Mais il faut remarquer que presque toutes les « bodegas » qui se mettent à pratiquer le vieillissement et la mise en bouteilles sont situées en Haute Rioja et Rioja Alavesa. La Basse Rioja reste à l'écart et continue à produire de bons vins de table à consommer dans l'année.

La différenciation régionale

La distinction entre une Rioja occidentale comprenant la Haute Rioja et la Rioja de l'Alavesa, et une Rioja orientale ou Basse Rioja correspond à des différences sensibles dans les types de vins produits, différences qui traduisent elles-mêmes des contrastes importants au point de vue du climat, des sols et des cépages utilisés.

La Basse Rioja a un climat nettement plus sec que celui de la Rioja occidentale. Logroño, qui est situé dans une zone de transition que l'on pourrait appeler la Rioja centrale, reçoit à peine 400 mm et à l'extrémité orientale de la Rioja, à Alfaro, il tombe moins de 300 mm (moyenne de 284 mm, mais pour une série d'années assez courte). La comparaison des graphiques ombro-thermiques de Logroño et de Haro (fig. 1) montre très bien que vers l'Est les pluies de printemps deviennent moins abondantes et qu'en été la sècheresse s'accentue alors que la température s'accroît : 21,5° à Logroño contre 20° à Haro en août. On a donc un allongement et une aggravation de la période sèche selon la définition proposée

par Gaussen (période pendant laquelle les précipitations sont inférieures à deux fois la température moyenne du mois considéré). Le climat de la Basse Rioja devient nettement plus « méditerranéen » et l'olivier y fructifie d'ailleurs beaucoup mieux qu'en amont.

Les différences pédologiques ne sont pas moins sensibles. Certes la majeure partie des sols de la Rioja sont basiques (pH entre 7,8 et 8,7) et manquent de phosphore et de potassium, sauf dans quelques secteurs de la Rioja Alavesa. Cependant les vignobles de qualité de cette dernière et d'une partie de la haute Rioja à proximité de l'Ebre, sont plantés sur des terres argilo-calcaires jaunâtres (arcillo-calcáreo) alors que les vignobles de la Basse Rioja sont installés sur des sols alluviaux et plus encore sur des sols argilo-ferreux rougeâtres (arcillo-ferroso) (Ruiz Hernandez, 1972, 1973, 1974).

Il n'est donc pas étonnant que les vins produits en Basse Rioja se différencient nettement de ceux de la Haute Rioja; ils sont plus alcoolisés, ont une plus grande richesse en fer mais une matière colorante plus instable, ils contiennent beaucoup d'acide tartrique mais moins d'acide malique qu'en Haute Rioja et la fermentation malolactique est peu fréquente. Cependant ces caractéristiques s'expliquent non seulement par des conditions climatiques et pédologiques particulières mais aussi par l'utilisation de cépages différents.

Dans l'ensemble de la zone d'appellation « Rioja » les viticulteurs doivent utiliser les cépages malvasia, garnacha blanca et viura pour les vins blancs. tempranillo, garnacho, graciano et mazuela pour les vins rouges (Ministerio de Agricutura, 1965; Sanz Carnero, 1975).

Les cépages blancs n'occupent qu'une superficie restreinte; bien que le vin blanc ne représente que 10 p. 100 de la production totale de la Rioja, il a fallu autoriser certaines années l'entrée de vin nouveau (environ 70 000 hl en 1972) qui ont été ensuite vieillis dans la Rioja. Mais cette pratique doit disparaître avec la plantation de nouveaux vignobles de blanc. On encourage en particulier l'extension de la malvoisie, cultivée depuis des siècles en Rioja : elle donne des vins de qualité, mais moins alcoolisés que le garnacho blanco qui vient d'Aragon, ou que la viura probablement originaire de la Catalogne où elle s'appelle macabeo.

Ce sont les vins rouges qui font surtout la célébrité de la Rioja. Parmi les cépages utilisés, le tempranillo est le plus important : son origine se perd dans la nuit des temps mais il est très semblable au cencibel de la Manche et il semble parfaitement adapté aux conditions climatiques de la Haute Rioja où il constitue 60 p. 100 du vignoble, et de la Rioja Alavesa où il représente les trois quarts de l'encépagement; comme son nom l'indique, il mûrit précocement et complètement et donne un vin moyennement alcoolisé, de grande finesse et qui vieillit bien. Le graciano, lui aussi très ancien dans la région, est peu productif et donne un vin peu alcoolisé mais avec un fort bouquet. Le mazuela qui viendrait d'Aragon (Cariñena) et correspondrait au Carignan, est également de bonne qualité mais il mûrit tardivement et, trop sensible à l'oïdium, a beaucoup reculé. Par contre, le garnacho tinto, également aragonais, résistant bien aux maladies cryptogamiques, s'est progressivement étendu. Or s'il est parfaitement adapté au climat chaud et sec de la Basse Rioja, il a quelques difficultés à mûrir parfaitement en Haute Rioja; de plus il n'a pas la finesse du tempranillo.

Le garnacho tinto est aujourd'hui le cépage essentiel de la Basse Rioja (plus de 80 p. 100 de l'encépagement); cette région produit donc surtout de bons vins de table, fortement alcoolisés (13,5 à 16,5° généralement), élaborés pour la majeure partie dans des Coopératives (fig. 2) et vendus en vrac dans l'année sous l'appellation « Rioja » à une clientèle d'Espagne (Pays Basque) ou de l'Étranger (Suisse,

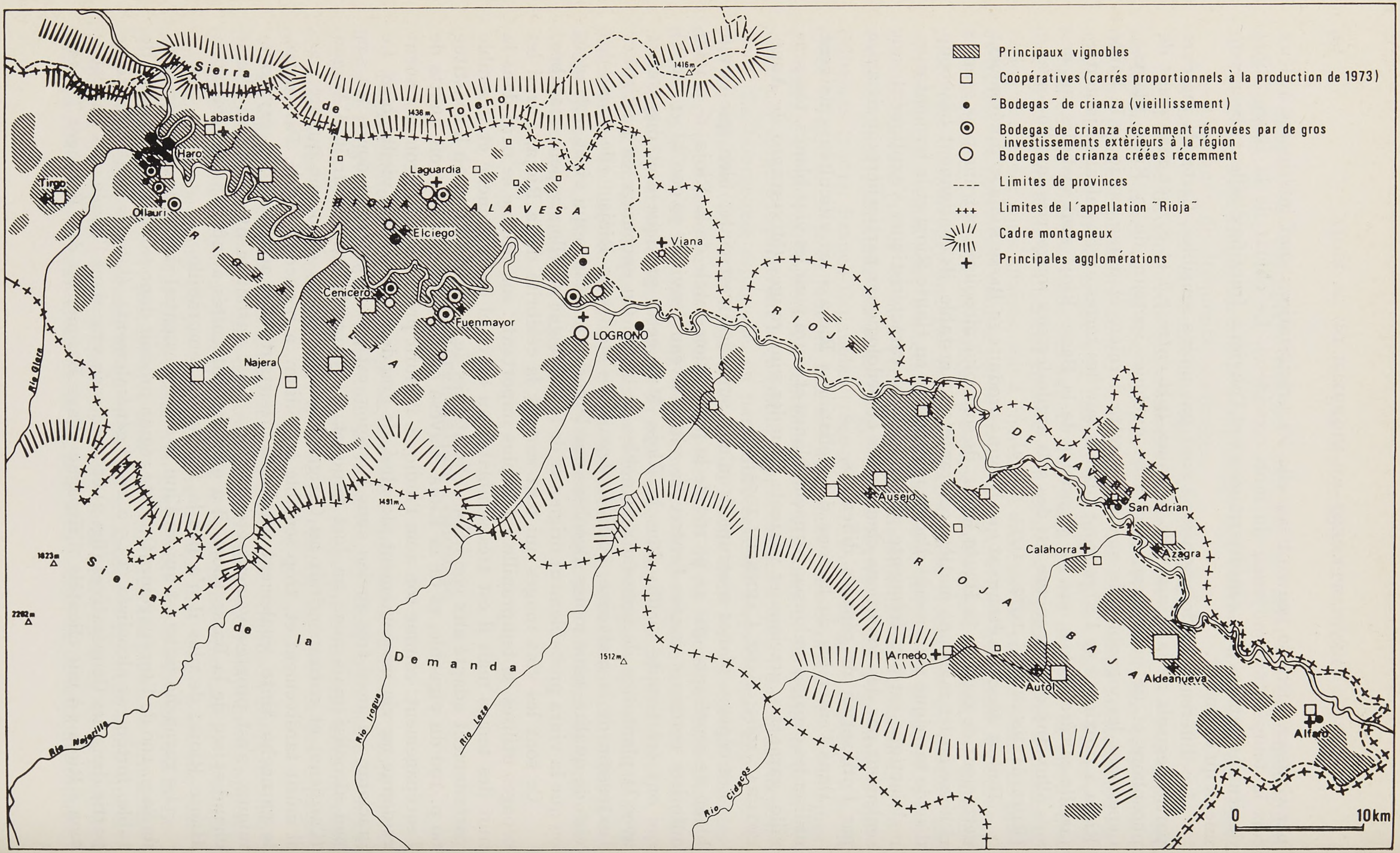


FIG. 2. — *Le vignoble de la Rioja.*

Allemagne...) où ils servent souvent à couper des vins plus faibles (REVISTA A.N.I.A., 1974).

Dans la Haute Rioja et la Rioja Alavesa, on utilise le garnacho pour améliorer le degré et la vigueur des vins que l'on veut faire vieillir, en particulier lorsqu'on désire obtenir des vins qui ont beaucoup de corps et que l'on appelait jadis « de tipo Borgoña » : on met par exemple 25 p. 100 de garnacho, avec 50 p. 100 de tempranillo, 15 p. 100 de graciano et 10 p. 100 de mazuela. Par contre, pour certains vins de type Bordeaux, le garnacho n'apparaît pas et le tempranillo constitue les trois quarts du moût. Parfois, on ajoute un dixième ou un huitième de malvoisie, qui donnera au vin vieux plus de nez.

En fait chaque bodega a sa formule mais la prépondérance du tempranillo et les apports de graciano et de mazuela assurent aux vins de la Rioja occidentale un bouquet et une finesse remarquables. Ce sont des vins secs, moyennement alcoolisés (11-12°), très aromatiques; leur forte acidité leur permet de vieillir lentement tout en s'affinant. Il y a cependant à l'intérieur même de la Rioja occidentale des nuances importantes : ainsi la région de San Asensio produit surtout des « claretes » peu alcoolisés et de saveur agréable alors que la Rioja Alavesa fournit plutôt des « tintos » ayant plus de degré et d'arôme. D'où l'intérêt de faire des assemblages de vins de parties différentes de la Rioja : certains vins de la Rioja Alavesa obtenus par pressurage de grappes entières ont un très fort bouquet mais une acidité assez basse (47-60 m.e.q. /l). Ils se conserveraient mal si on ne les mélangeait pas avec des vins de la Rioja de Logroño nettement plus acides (80-100 m.e.q. /l).

Le fait capital est qu'au moment de l'adoption des techniques bordelaises, les producteurs de la Rioja ont eu la sagesse de ne pas abandonner leurs cépages traditionnels au profit de cépages français. Quelques plantations de cabernet-sauvignon ont eu lieu jadis : les plants du Bordelais donnèrent des vins satisfaisants mais qui n'avaient plus le bouquet caractéristique des grands vins de la Rioja. La plantation de variétés étrangères est aujourd'hui interdite.

FIG. 2. — *Le vignoble de la Rioja.*

L'évolution récente et le problème du maintien de la qualité

Comme tous les vignobles de qualité, la Rioja est vulnérable et les profondes transformations qui l'affectent depuis quelques années ne doivent pas entraîner une baisse de la qualité. C'est à quoi s'efforcent de veiller le Consejo Regulador et la station œnologique de Haro.

Les modifications dans la structure même du vignoble peuvent avoir en effet d'importantes conséquences, bénéfiques ou au contraire dangereuses pour la qualité des vins produits. La majeure partie du vignoble de la Rioja est cultivé par de petits propriétaires; ainsi en 1970 la superficie moyenne des exploitations était seulement de 1,61 ha dans la province de Logroño. Depuis plusieurs décennies l'exode rural avait provoqué le déclin progressif de la superficie en vignes, les parcelles mal situées et trop en pente étant de plus en plus abandonnées. Les vignes qui subsistent aujourd'hui sont souvent trop petites, les ceps sont trop vieux, trop serrés, pour permettre la mécanisation des travaux agricoles.

A côté de cette poussière de petites exploitations, il existe quelques grands domaines viticoles qui appartiennent aux grandes « bodegas ». Certains sont anciens tel le vignoble du Marqués de Riscal qui couvre 117 ha, la viña Pomal des Bodegas

Bilbainas, ou la viña Tondonia que Rafael Lopez de Heredia défricha et planta en 1913-14; installés sur des sols bien choisis, ces vastes vignobles produisent une bonne partie des vins les plus réputés de la Rioja. Mais à partir de 1971, le développement des exportations et la hausse des prix du vin provoquèrent d'importants achats de terres et la création d'une nouvelle génération de grands vignobles d'un seul tenant. Dans certains cas, de petites parcelles viticoles furent rachetées et regroupées : ainsi une société réussit à acquérir 155 parcelles appartenant à 63 propriétaires différents, ce qui lui permit de constituer un vaste vignoble de 70 ha. De tels achats provoquèrent une hausse spectaculaire du prix de la terre, au désespoir des petits propriétaires dynamiques qui auraient voulu agrandir leur exploitation.

A plusieurs reprises des superficies importantes furent acquises dans des secteurs non viticoles jusqu'alors, en particulier en Basse Rioja, et les acheteurs obtinrent l'autorisation d'y planter de nouveaux vignobles. Mais on peut se demander si, dans la localisation de certains d'entre eux, les hasards des achats n'ont pas joué un rôle plus important que la qualité des sols ou les avantages climatiques. Il faut d'ailleurs remarquer que plusieurs grandes entreprises ne se sont pas constituées de domaine foncier et préfèrent acheter le raisin ou le vin nouveau qu'elles peuvent ainsi choisir et sélectionner. De toute façon, la période de prospérité qui s'était accompagnée d'autorisations de plantation et avait enrayé momentanément le déclin des superficies viticoles n'a pas duré et depuis 1975, le Consejo Regulador ne permet plus la plantation de nouvelles vignes.

Pour éviter de rompre l'équilibre dans la répartition des variétés cultivées dans la Rioja, l'Instituto Nacional de Denominaciones de Origen autorisa en août 1971 la plantation sans restriction des variétés malvasia et viura pour les blancs et tempranillo pour les rouges : cette mesure était destinée, non pas à exclure le garnacho qui donne en Basse Rioja de bons vins de table et qui est utile pour renforcer certains vins de la Haute Rioja mais pour empêcher que sa part dans les vins destinés au vieillissement ne s'accroisse trop, aux dépens du bouquet traditionnel. On s'efforça également de contrôler les rendements, dont une augmentation spectaculaire nuirait certainement à la qualité.

Un autre danger que doit éviter la Rioja est l'adoption de techniques de vinification trop industrielles, qui fournissent certes des vins standardisés satisfaisants mais ne permettront plus d'obtenir des vins d'une grande finesse.

40 p. 100 environ de la production de la Rioja est effectuée par des Coopératives. La première a été créée en 1943 mais la plupart des 31 coopératives actuelles datent de la période 1950-1966. Leur implantation a été sans nul doute bénéfique et certaines sont d'ailleurs fort bien équipées. Cependant très peu imitent celle de Labastida qui met en bouteilles une proportion appréciable de sa production et elles se contentent généralement de céder leur vin soit à des négociants qui l'expédient par camions ou wagons citernes vers les centres de consommation, soit à des bodegas de crienza qui sélectionnent les meilleurs produits pour les faire vieillir dans leurs chais.

Les viticulteurs indépendants (cosecheros), généralement de petits exploitants, vinifient eux-mêmes 30 p. 100 de la production et vendent ensuite leur vin nouveau. Ces producteurs individuels restent très nombreux dans certaines régions, par exemple en Rioja Alavesa où le Cadastre de 1976 a recensé 394 entreprises de vinification dont 318 ont une « bodega » ayant moins de 1 000 hl de capacité. La qualité est évidemment inégale, mais souvent bonne et les grandes entreprises font naturellement une sélection impitoyable.

Un peu plus d'un dixième de la production est réalisé par des « almacenistas »,

des grossites, qui élaborent du vin avec le raisin acheté à des petits exploitants mais qui ne le font pas vieillir et le vendent en vrac.

Reste la catégorie des « criadores-exportadores », c'est-à-dire des entreprises qui pratiquent l'élevage du vin, le vieillissement et qui ensuite l'exportent. Ils produisent environ un cinquième du vin, soit grâce à leurs domaines viticoles soit en achetant du raisin à de petits viticulteurs. Ils achètent également du vin nouveau aux producteurs individuels ou aux Coopératives. Leurs chais de vieillissement (bodegas de crianza) sont surtout concentrés à Haro, Cenicero, Fuenmayor, Laguardia et Logroño, c'est-à-dire en Haute Rioja et en Rioja Alavesa (fig. 2); le règlement de l'appellation Rioja a d'ailleurs délimité une zone où ils peuvent s'installer et qui s'étend sur 26 communes seulement.

Ces « criadores-exportadores », qui sont actuellement une trentaine, peuvent se classer en plusieurs types :

— Certaines entreprises, fondées dès le XIXe siècle, sont des « bodegas » de tradition qui produisent des vins de grande qualité, gardent souvent encore une structure familiale et se sont montrées très prudentes dans la période d'euphorie des années 1970. Citons parmi les plus prestigieuses Marqués de Murrieta, Marqués de Riscal, López de Heredia, les Bodegas Bilbainas...

— Un certain nombre de bodegas, également anciennes et de grand renom, ont été rachetées par des grandes sociétés venues d'autres régions. Les anciennes installations ont été soit complètement rénovées, soit complétées par des « bodegas » ultra modernes, souvent construites en pleine campagne. Ainsi les bodegas franco-españolas de Logroño et Federico Paternina de Haro sont passés sous le contrôle de la puissante Rumasa, société originaire de Jerez (Ruiz Mateos). Montecillo de Fuenmayor a été racheté par Osborne, de Puerto de Santa Maria, et Croft de Jerez possède les bodegas Lagunilla de Cenicero. Des sociétés américaines ont pris des participations dans quelques bodegas telles que AGE Bodegas Unidas de Fuenmayor ou Bodegas Palacio de Laguardia.

— De nouvelles bodegas ont été créées de toutes pièces au cours des dernières années. Quelques-unes sont de dimension modeste : au cours des dernières années, Larrea Rabanera à Elciego ou López Agos à Fuenmayor ont été créées par des groupes d'amateurs de la région. D'autres sont de grandes entreprises où interviennent des capitaux extérieurs à la Rioja, tels Campo Viejo dont les vastes bâtiments ont été construits par la S.A.V.I.N. de Saint-Sébastien à une douzaine de kilomètres de Logroño, la Sociedad General de Vinos, filiale de Domecq, dont les grands chais sont en voie d'achèvement à Elciego, et les installations « fonctionnelles » des Bodegas Ollara, au Nord-Est de Logroño.

La plupart des bodegas qui ont été construites ou reconstruites ces dernières années ont une capacité de stockage considérable. Plusieurs d'entre elles, Paternina, Campo Viejo, Berberana, atteignent 300 000 hl, ce qui, même en tenant compte de la conservation du vin pendant plusieurs années, représente un chiffre impressionnant. Paternina possède quelque 32 000 barriques; Campo Viejo 30 000. Les investissements ont dépassé, pour une seule entreprise, 1 milliard de pesetas...

Un tel accroissement de la capacité des bodegas pose le problème de l'approvisionnement en matière première, c'est-à-dire en raisin ou en vin nouveau. La concurrence entre les grandes bodegas est évidemment favorable aux petits viticulteurs qui peuvent vendre à des prix intéressants. Mais il faut que le Consejo Regulador maintienne un strict contrôle de la qualité des vins vieillis et mis en bouteilles. Car il serait dangereux, pour essayer d'amortir à tout prix des investissements considérables, de lancer sur le marché une masse de vins standardisés sans grand caractère.

Au total on constate dans l'évolution actuelle une tendance de plus en plus grande à la diversification et à la hiérarchisation des types de vins produits sous la dénomination « Rioja ». Trois catégories s'individualisent :

— Les bons vins de table ordinaires, expédiés en wagons ou en camions citernes vers les centres de consommation espagnole ou étrangère.

— Les vins de bonne qualité provenant d'assemblages de moûts venant souvent de diverses parties de la Rioja et parfois de vins provenant d'années différentes. Mis en bouteilles après au moins un an de barrique, ils se vendent bien, en particulier à l'exportation, parce que leurs prix sont raisonnables et leur qualité très régulière d'une année à l'autre. Mais tous ne possèdent pas le bouquet original de la Rioja.

— Les grands vins soigneusement élaborés et élevés, restent au moins trois ans en barriques avant d'être mis en bouteilles. Certains résultent d'assemblages particulièrement soignés, d'autres proviennent d'un vignoble bien défini, d'une « viña » dont le nom est mentionné sur l'étiquette. Ces vins vieillissent bien, ceux de « reserva » ont plus de 5 ans, ceux de « gran reserva » plus de 9 ans.

Ils sont millésimés et c'est grâce à eux que la Rioja a acquis ses lettres de noblesse. La meilleure preuve en est certainement les prix extraordinaires atteints par certaines vieilles bouteilles de « collection » dans des ventes publiques comme celles de Barcelone en mars 1976.

Summary

The conditions for the Rioja (Spain) vineyard development

The vineyards of Rioja (42 000 ha) produce the most highy esteemed table wines in Spain. The climate with a wet spring, a moderately hot summer and a considerable degree of insolation until the harvest, is found to favourise quality wine production. However until the mid-nineteenth century only wines for everyday consumption were made in the Rioja. On adopting Bordelais techniques, in particular ageing wines in oak casks, quality wines were produced but which at the same time retained their originality and characteristic bouquet. This being due to the wine-growers who prudently continued using their traditional grape varieties: the "tempranillo" and "graciano" in particular. The wineries which age wine (bodegas de crianza) are found essentially in the western region of the Rioja (Rioja Alta and Rioja Alavesa). In the eastern lower Rioja the climate is drier and hotter and wines with a high alcoholic content (13°,5 to 16°,5) are made from the grape variety "garnacho tinto" in cooperatives and sold in bulk. At about thirty vineyards wines are aged and bottled for exportation. Among these vineyards are those which produce a large percentage of the best Riojan wines. Recently large companies have entered the Rioja and built very modern large capacity wineries. They now bottle wine on a large scale. The hierarchy of wines produced under the name Rioja has a tendency to expand.

Key-words: *Vineyards of Rioja — Geography — Wine types — Production.*

Références bibliographiques

HUETZ de LEMPS A., 1967. *Vignobles et Vins du Nord-Ouest de l'Espagne*, Faculté Lettres Bordeaux, Vol. 1 et 2.

HUETZ de LEMPS A., 1970. L'influence bordelaise dans l'évolution du vignoble de la Rioja, *in Vignobles et Vins d'Aquitaine*, Fédération Historique Sud-Ouest, p. 367.

LARREA REDONDO A., 1973. Travaux sur la climatologie de la Haute Rioja, *Semana Vitivinícola*.

LARREA REDONDO A., RUIZ M., 1974. Propuesta de una carta de cosechas de calidad en Rioja, *Anales I.N.I.A.*, **1**, 241-250.

LARREA REDONDO A., 1976. Segunda Aportacion (Communication personnelle de l'auteur).

MINISTERIO DE AGRICULTURA, 1965. *Vides de la Rioja*, et 2e édition, 1972, Madrid.

REVISTA A.N.I.A., 1974. Especial Vinos de Rioja (recueil d'articles) *Epoca, II*, **4**, juillet-août.

RUIZ HERNANDEZ M., 1972. Sobre las características geologicas de la zona Rioja y su influencia vitivinicola, *Semana Vitivinícola*, 1372.

RUIZ HERNANDEZ M., 1973. Sobre las caracteristicas geologicas de la zona Rioja y su influencia vitivinicola, *Semana Vitivinícola*, 1394.

RUIZ HERNANDEZ M., 1974. Mapa de suelos vitivinícola de Rioja, *Semana Vitivinícola*, 1453.

RUIZ HERNANDEZ M., 1977. Trivium qualitatis Rioja, *Semana Vitivinícola*, 1598.

SANCHEZ GABRIEL M., FERNANDEZ GIRO, 1974. Introducción al estudio del clima de la Rioja, *Servicio meteorológico Nacional*, Madrid.

SANZ CARNERO F., 1975. *El viñedo español*, Ministerio de Agricultura, Madrid.

SEGUNDAS JORNADAS TECNICAS DE RIOJA, 1972. *Vid y vino Haro y Logroño*, 1.110.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 69-70.

INTERVENTION

Relation entre les propriétés d'oxydation du moût et la qualité du vin de la Rioja

R. HERNANDEZ

Station de Viticulture et d'Œnologie de Haro (Espagne)

Nous avons étudié l'oxydation des moûts de raisins sains non sulfités de la Rioja; cela nous a permis d'améliorer la qualité du vin jeune et du vin vieux. Voici un résumé de nos observations :

— L'évolution et la qualité du vin ne sont pas conditionnées par la fermentation tumultueuse.

— Les raisins ont des compositions très différentes en enzymes d'oxydation.

— Dans le raisin les enzymes d'oxydation sont d'origine génétique.

— Dans le raisin les enzymes d'oxydation sont influencées par des facteurs climatiques. Une insolation moyenne minimale de 2 400 heures par an est nécessaire pour obtenir un raisin riche en enzymes d'oxydation.

— L'emploi d'engrais présente également une influence.

— Dans les vins provenant de raisins riches en enzymes d'oxydation des processus ADH ont tendance à se développer.

— Dans les vins provenant de raisins riches en enzymes d'oxydation s'opère une sélection de levures à intense activité ADH.

— Dans les vins provenant de raisins pauvres en enzymes d'oxydation la survie des levures est très faible.

— Au cours du vieillissement des vins provenant de raisins riches en enzymes d'oxydation les matières colorantes ont tendance à précipiter dans le cas des vins rouges; les vins blancs ont tendance à madériser.

— Au contraire, dans les vins provenant de raisins pauvres en enzymes d'oxydation les matières colorantes restent stables.

— Les levures pendant la fermentation et au cours du vieillissement ne dépendent pas de la région, mais des proporiétés enzymatiques du raisin, aussi bien du point de vue sélection spontanée des espèces que du point de vue processus biochimiques.

— Au cours de la première année, les vins provenant de raisins riches en

enzymes d'oxydation répondent à l'addition de SO_2 par une rapide transformation de celui-ci en sulfate.

— Les vins provenant de raisins pauvres en enzymes d'oxydation répondent aux additions de SO_2 par une transformation de celui-ci en soufre ou en hydrogène sulfuré.

— L'importance technologique de l'évolution du cation fer naturel ou exogène est également conditionnée par la qualité enzymatique du raisin.

Le vin provenant de raisin riche en oxydases contient normalement le fer à l'état ferrique, tandis que dans les vins provenant de raisins pauvres en oxydases le fer se trouve normalement à l'état ferreux.

— Pour des valeurs inférieures à 1 900 heures d'insolation, les vins sont caractérisés par les arômes du fruit. La synthèse des colorants est faible et la teneur en PPO est souvent plus élevée que celle à laquelle on pourrait s'attendre à 2 100 heures d'insolation.

Nos dernières recherches montrent une influence importante du cuivre naturel ou exogène sur les conditions de ces processus.

Le cation cuivre lorsqu'il existe dans le vin en proportion de 1 mg/l facilite la vie des levures dans les vins rosés et blancs de la Rioja.

Nous sommes arrivés à ces résultats par l'étude dans toute la région de la Rioja des différences d'oxydation entre les moûts de Tempranillo, Mazuelo ou Graciano, Viura, Malvasie et Grenache.

Les variétés Mazuelo et Tempranillo ont une faible valeur PPO tandis que les variétés Grenache et Malvasie ont une valeur PPO élevée. Ces résultats, obtenus lors de la vinification dans la Rioja sont également valables pour d'autres variétés et d'autres régions viticoles espagnoles. Les recherches sur la valeur PPO ont été effectuées par la méthode au pyrocatéchol.

Nous étudions actuellement la dynamique œnologique entre la valeur PPO comme origine et l'activité ADH comme conséquence.

L'activité PPO du raisin opère une action sélective sur les espèces de levures existant dans l'« habitat » viticole.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 71-79.

Vignobles et vins de l'U.R.S.S.

G. G. VALOUIKO

Station de Recherches Magaratch, Yalta. (U.R.S.S.)

Résumé

Les vignobles de l'U.R.S.S. sont situés dans les conditions géographiques les plus variées, aussi les vins des diverses régions diffèrent-ils les uns des autres.

Le vin que produit la vigne doit être considéré comme le reflet d'un complexe, constitué par le cépage, les facteurs écologiques et géographiques, les pratiques agrotechniques, la technologie de préparation du vin, etc.

Les facteurs agrotechniques, écologiques et géographiques influent considérablement sur la qualité de la vendange et du vin. Cette influence est très complexe et diversifiée. C'est pourquoi les études n'ont porté jusqu'à présent que sur des facteurs séparés et que le problème n'a pas été analysé dans son ensemble.

Mots clés : *Vignobles de l'U.R.S.S. — Cépages — Écologie — Géographie — Types de vins — Technologie.*

Influence des facteurs agrotechniques, écologiques et géographiques de culture de la vigne sur la qualité du vin

En U.R.S.S., la viticulture et la viniculture sont pratiquées dans 11 des républiques fédérées. La superficie des vignobles de l'U.R.S.S. était au 1-1-1977 de 1 253 000 ha. Les vignobles sont, en majeure partie, situés sur le territoire de R.S.S. d'Ukraine (294 000 ha), de Moldavie (280 000 ha), de R.S.F.S.R. (199 000 ha) et d'Azerbaïdjan (174 000 ha). Les vignobles d'Union Soviétique sont situés dans les conditions écologico-géographiques les plus variées, aussi les vins des diverses régions de l'U.R.S.S. se distinguent-ils nettement les uns des autres. La production de vin a atteint près de 30 millions d'hl en 1976.

En 60 ans de régime soviétique, l'U.R.S.S. a recréé une importante industrie vinicole, dotée d'un équipement à grand rendement pour la culture de la vigne, le traitement et l'embouteillage du vin. L'U.R.S.S. a littéralement mis sur pied une industrie vinicole dans les Républiques de Kirguizie, du Kazakhstan, de Turkménie, du Tadjikistan et d'Azerbaïdjan. L'établissement des vignobles des

diverses régions de l'U.R.S.S. s'est constitué à partir des cépages locaux, tels que Rkatsitiéli, Sapiéravi, Matrassa, Khinkogny, Tierbache, Mtsvané, Baïane-Chirieï, et par l'introduction des meilleurs cépages européens : cabernet sauvignon, aligoté, riesling du Rhin, pinot, traminer, sylvaner, muscat, etc.

Pour préparer un vin de haute qualité, il est indispensable de vendanger quand la composition du moût de l'échantillon moyen de grains est proche des données présentées dans le tableau 1. Les données de ce tableau permettent de prévoir approximativement l'utilisation du raisin pour la préparation de tel ou tel type de vin. Ces données sont calculées pour une vinification classique. A l'aide de procédés spéciaux de vinification (chauffage de la vendange, levures sélectionnées, temps de contact du moût plus ou moins long avec les pellicules, etc.), on peut obtenir la teneur nécessaire en composants indiqués dans le tableau, même si leur quantité dans le raisin est différente.

Le vin et les autres produits obtenus à partir du raisin sont le reflet d'un ensemble complexe : cépage, facteurs écologiques et géographiques, procédés agrotechniques, vinification, etc. S'il est possible de changer l'agrotechnique et les procédés de vinification, les erreurs dans le choix des cépages et dans leur implantation ne peuvent être éliminées que par des moyens coûteux tels que l'arrachage des vignobles déjà plantés et leur remplacement ou le surgreffage avec un autre cépage, etc.

Lors de la sélection des cépages pour de nouvelles plantations, il convient de choisir les plus prometteurs, considérer leurs avantages sur le plan économique, leur rendement, leur aptitude à l'accumulation des sucres, la qualité des vins qu'ils produisent, leurs particularités biologiques et leur adaptation aux conditions naturelles du lieu donné. Il y a des cépages qui ont une grande plasticité écologico-géographique et donnent des vins de grande qualité dans les diverses régions du pays : ce sont le Rkatsytiéli, le Riesling, l'Aligoté, le Cabernet, le Sapiéravi, le Khindogny, le Matrassa, etc.

Lors du choix des cépages, il faut considérer également les époques de maturation, une sélection correcte de cépages à maturité précoce, moyen et tardif permettant de répartir régulièrement le traitement de la vigne sur toute la saison de vinification. Dans les vignobles de plusieurs régions de l'U.R.S.S. prédominent les cépages à maturation tardive, ce qui ne garantit pas l'obtention d'une production de haute qualité. L'importance des précipitations atmosphériques, entraînant la pourriture, et les gelées précoces dans la zone septentrionale de viticulture font que la vendange a une faible teneur en sucre et une forte acidité.

Le climat semble bien être le facteur physico-géographique essentiel de la qualité de la production. Mais son influence est tellement modifiée par d'autres facteurs qu'il serait inexact de déterminer les directions de telle ou telle région uniquement en fonction des conditions climatiques.

On sait qu'un climat chaud provoque dans le raisin une forte accumulation de sucres et d'extrait. Mais, dans le même temps, il diminue l'acidité et, en particulier, l'acide malique. Dans les régions où la chaleur est insuffisante, le raisin a une basse teneur en sucres pour une acidité élevée.

La disposition même des grappes sur le pied joue un rôle dans l'accumulation des sucres : les grappes situées plus près du sol (en particulier quand les sols sont foncés), accumulent davantage le sucre, car la température à ras de terre est plus élevée qu'en haut du cep.

Avec un climat modérément chaud (Moldavie, Ukraine, Caucase septentrional) on obtient des vins de table fins, des jus de raisin, des vins de base pour la préparation des vins mousseux et de vins destinés à la distillation (eaux-de-vie). Par contre,

TABLEAU I

Composition du raisin recommandée pour obtenir les divers types de vins

Produits obtenus à partir du raisin	Acidité de titration exprimé en acide tartrique g/l	Teneur du jus en				pH
		sucre %	substances phénoliques g/l	substances colorantes g/l	azote g/l	
Vins blancs :						
Vin mousseux	7 à 11	16 à 19	0,5	—	0,15 à 0,5	2,8 à 3,1
Vin de table	6 à 9	17 à 20	0,8	—	0,4 à 0,6	3,0 à 3,5
Vin pour la distillation des eaux-de-vie	8 à 12	15	0,5	—	0,3	2,8 à 3,2
Vin fortifié	5 à 7	20	0,5 à 1,0	—	0,5 à 0,7	3,2 à 3,8
Vin madérisé	5 à 7	20	1,0 à 1,5	—	0,7 à 1,0	3,5 à 4,0
Vin de dessert	4 à 7	22	1,0	—	0,4 à 0,8	3,2 à 3,8
Vin de liqueur	4 à 6	24	1,0	—	0,4 à 0,8	3,5 à 4,0
Vins rouges :						
Vin de table	5 à 8	18 à 22	1,5 à 2,0	0,5 à 1,0	0,5 à 0,6	3,2 à 3,8
Vin fortifié	5 à 8	20	1,5 à 2,5	0,75 à 1,0	0,6 à 0,8	3,5 à 4,0
Vin de dessert	4 à 7	22	1,0 à 1,5	0,5 à 0,8	0,4 à 0,6	3,2 à 3,8
Vin de liqueur	4 à 6	24	0,75 à 1,25	0,3 à 0,6	0,5	3,5 à 4,0

les climats chauds (Arménie, côte méridionale de Crimée, Asie centrale) créent les conditions voulues pour la production de vins fortifiés, de vins de dessert ou de vins liquoreux de haute qualité.

Les vignobles situés sur les côteaux donnent, en général une production de meilleure qualité, bien que la récolte soit supérieure sur les terrains de plaine. Les meilleurs vignobles du monde sont tous disposés sur les versants des côteaux ou sur des plateaux élevés.

Les amendements minéraux influent diversement sur la qualité du raisin et du vin. Une alimentation exclusivement azotée et une dose élevée d'engrais azotés permet d'élever l'acidité du raisin. Au contraire, une nourriture potassique et des doses élevées d'engrais potassiques diminuent l'acidité du raisin. Un amendement complet n'apporte pas de grands changements dans la teneur en acidité et conserve à chaque cépage ses particularités.

La quantité de substances aromatiques des variétés muscat peut être augmentée par des apports extra-radiculaires de potassium et de phosphore.

La teneur en anthocyanes augmente avec des engrais potassiques et phosphoriques et diminue avec un excès d'engrais azoté.

La teneur élevée du vin en phosphore permet sa maturation rapide et peut provoquer une casse blanche. Les engrais potassiques provoquent une élévation de la teneur en sucre du raisin et une diminution de l'acidité fixe, puisque la teneur du vin en potassium s'accroît.

On observe une accumulation plus élevée des substances azotées dans le raisin durant la maturation et, en conséquence, dans le moût et le vin, les années où les précipitations atmosphériques sont abondantes pendant la période de végétation (Zintchenko, 1964). La faculté d'accumulation des substances azotées dépend des particularités biochimiques du cépage et des conditions du milieu extérieur. En sélectionnant les variétés et en régularisant les conditions extérieures par l'introduction d'engrais organiques et minéraux, d'arrosages, etc... on peut atteindre une plus grande accumulation de substances azotées dans le jus de raisin. Ainsi, par des procédés agrotechniques convenablement choisis, on peut obtenir la teneur optimale en azote en vue de la production de vin d'un type donné.

La teneur du raisin en substances aromatiques dépend des conditions climatiques de l'année et varie suivant les années. Les conditions nécessaires à l'accumulation des sucres et des substances aromatiques ne sont pas les mêmes et, dans des conditions météorologiques données, le sucre peut s'accumuler, alors que l'accumulation des substances aromatiques peut être retardée.

Il est établi (Datounachvili, 1959) que la concentration maximale en substances aromatiques se trouve dans la pellicule et qu'elle est nettement moindre dans le moût. C'est pourquoi une macération du moût avec les pellicules peut l'enrichir en substances aromatiques, car, celles-ci étant plus concentrées dans les pellicules diffuseront dans le moût.

Le maximum d'accumulation de substances aromatiques dans le grain est atteint dans des délais différents pour les divers cépages. Pour le Muscat blanc et l'Aligoté, le maximum s'observe durant la période de maturité industrielle avec une teneur en sucre de 20 à 23 p. 100 et pour le Riesling de 17 p. 100. Pour tous les cépages, la teneur en substances aromatiques dans les grains de raisin augmente d'abord jusqu'à un maximum déterminé pendant la maturation et diminue ensuite quand les grains sont trop mûrs.

Pendant la fermentation, une partie des substances volatiles, en particulier celles provenant du raisin, est libérée avec l'acide carbonique. Le vin s'appauvrit d'autant plus en substances aromatiques que la température de fermentation

est plus élevée. La perte de substances aromatiques durant le processus de fermentation abaisse la qualité des vins obtenus (VALOUIKO), 1969.

On doit noter l'influence positive qu'ont sur la qualité du raisin et du vin certains oligoéléments (bore, manganèse, molybdène, etc.). Le manganèse et le bore augmentent la teneur en sucre (de 1,5 à 1,7 p. 100) et diminuent l'acidité. Il a été montré (FROLOV-BAGRILEIEV et TROITSKII, 1950) que le bore et surtout le manganèse permettaient l'accumulation des substances élaborées dans les grains, augmentant ainsi la valeur gustative du vin.

Quand on utilise comme engrais extra-radiculaires le cobalt et le zinc, la teneur en sucre du jus de raisin s'élève de 1,5 à 2 p. 100 par rapport au témoin, alors que l'acidité de titration diminue de 0,6 à 0,9 g/l.

Suivant le porte-greffe, les vins obtenus diffèrent par leur teneur en alcool. Par exemple, en Géorgie soviétique, les vins du cépage Rkatsytiéli greffé sur chasselas × Berlandieri 41-b ont une teneur en alcool plus élevée que lorsque le même cépage est greffé sur Riparia × Rupestris 3 309. Des variations analogues se remarquent pour la teneur en extrait, en cendres, en acidité de titration, particulièrement en acide tartrique et malique.

Influence des conditions écologiques et géographiques de croissance sur la teinte du raisin

La teinte du vin dépend du cépage, des conditions écologiques de croissance du pied de vigne, des procédés agrotechniques, du degré de maturité du raisin et de la vinification.

On observe parfois une diminution de la teinte des variétés rouges; elle résulte essentiellement d'un apport mal dosé d'engrais nitriques, d'arrosages fréquents avant la vendange, d'une surcharge des pieds en vue d'obtenir une récolte abondante.

AKIMTSEV (1946) estime que l'apport d'engrais nitriques dans les sols pauvres en azote améliore la teinte des vins, mais qu'un excès d'azote l'altère. Ce qui influe sur la teinte du vin c'est l'acidité des sols; les vins provenant des vignes cultivées sur sols acides ont une teinte plus stables ils se conservent longtemps et se bonifient en vieillissant. Quand les vins proviennent de vignes cultivées sur sols neutres et alcalins, leur teinte passe facilement.

Il est possible d'intensifier la teinte des vins rouges par des apports de phosphore et de potassium qui permettent la formation d'anthocyanes dans la pellicule du raisin. Quand les vignobles reçoivent principalement des engrais azotés, il se forme beaucoup moins d'anthocyanes dans la pellicule du raisin que dans celle du témoin. Dans les essais de AROUTIOUNIAN *et al.* (1960), où, sur fond d'amendement total, on a donné un supplément de phosphore et de potassium, on constate, par comparaison avec le témoin, que les engrais phosphoriques ont élevé entre 10 et 60 p. 100 la quantité d'anthocyanes dans le raisin, et les engrais potassiques entre 12 et 66 p. 100. Quand on emploie des engrais azotés (nitrate d'ammoniaque) l'intensité de la teinte du raisin est un peu plus faible que dans le témoin. Les apports extra-radiculaires de phosphore et de potassium peuvent être un moyen d'intensifier la teinte du raisin et du vin.

La présence de petites quantités de glaise (de 20 à 30 p. 100) dans le sol a une action favorable sur la formation des substances colorantes. Sur les sols argileux le raisin est plus coloré que sur les sols sablonneux.

La quantité de matières colorantes dépend de la période des vendanges. Lorsque les raisins sont trop mûrs, les matières colorantes du raisin sont partiellement détruites. La couleur du raisin dépend aussi du poids de grappes par cep. KALOUGUINA (1959) a cité les résultats de l'expérience suivante : dans une pièce de vigne plantée en cépage Sérexia, on a donné à certains pieds une charge moyenne, à d'autres une charge inférieure à la moyenne, les troisièmes enfin étaient fortement surchargés. La vendange a été effectuée pied par pied le même jour. Sur les pieds dont la charge était inférieure à la moyenne, le raisin avait une teneur en sucre de 22 p. 100, sur ceux qui avaient une charge moyenne elle était de 17 p. 100, alors que les grains provenant des pieds fortement surchargés n'avaient que 10 p. 100 de teneur en sucre. La couleur de ces grains variait suivant la teneur en sucre. Pour une teneur de 22 p. 100, les raisins avaient une coloration intense, tandis qu'avec 10 p. 100 de sucre, la plupart commençaient juste à foncer.

Les expériences menées en Arménie par SAMVELIANE (1960) ont montré que l'accroissement de densité de plantation n'avait presque pas d'influence sur la teneur en substances colorantes à charge constante. Mais si l'on double la charge pour une même surface d'alimentation l'accumulation des anthocyanes diminue.

L'intensité de la couleur dépend directement des conditions de température auxquelles s'effectue la maturation de la vendange. OUNGOURIANE (1960) a établi qu'une température trop élevée ou trop basse durant la maturation du raisin ne permettait pas la formation d'une teinte intense des raisins rouges, ce qui est certainement lié à une nourriture minérale défavorable. Des observations menées durant 10 ans dans la région de Kodr (Moldavie) ont permis d'établir que la température optimale de maturation du raisin destiné à la préparation des vins rouges de table était de 18 à 20 °C. La qualité et la teinte du raisin ne dépendent pas de la somme des températures actives mais de l'intensité de la température dans la période de maturation. Avec une plus grande intensité de température la durée des diverses phases de végétation est raccourcie. La maturation du raisin commence plus tôt et se déroule durant des mois plus chauds, ce qui a une influence négative sur la qualité du raisin.

La teneur en substances colorantes des grains varie suivant les années, en fonction des conditions de température durant la période de maturation. L'intensité de couleur des grains est plus élevée lorsque les températures journalières moyennes sont plus modérées (18 ou 19 °C) que lorsqu'elles sont plus élevées (entre 21 et 25 °C) (GOLOFRIGUA et SOUTATINOV, 1966).

Il ressort de ce qui précède que la couleur requise des vins rouges est, en réalité, conditionnée surtout par la sélection rationnelle des cépages qui, dans les conditions d'une région donnée, peuvent donner une récolte capable de produire des vins bien colorés.

Il est donc important de bien fixer la date de la vendange des raisins de cépages rouges non seulement en fonction de la maturité industrielle du raisin, mais aussi en fonction de l'accumulation optimale des substances colorantes.

Le problème se pose depuis longtemps de savoir tenir compte de la teneur en substances colorantes, mais la solution s'est toujours heurtée à l'absence d'une méthode sûre et simple de détermination de la teneur du raisin en substances colorantes. Nous avons élaboré une méthode d'estimation objective de la couleur du raisin, fondée sur la photométrie. La méthode de détermination est assez simple et peut être utilisée par tous les laboratoires d'usines (VALOUIKO, 1973).

Le fait de maintenir des grappes dans l'obscurité influe fortement sur l'accumulation des substances colorantes du raisin. Les grains de ces grappes se colorent nettement plus tard que les autres, l'accumulation des pigments s'y produit

beaucoup plus lentement et la quantité de substances colorantes dans les grains qui ont mûri est presque 2 fois moins importante que dans ceux qui étaient exposés au soleil. La lumière solaire stimule l'accumulation des substances colorantes dans le raisin; le raisin obtenu dans des zones à faible nébulosité est donc plus coloré.

D'après KOROTKIEVITCH *et al.* (1950) la sécheresse a une très forte influence sur la teneur en tanins et n'a presque pas d'action sur les substances colorantes. Durant les années de sécheresse la teneur en tanins des grains est trois fois plus importante.

Nous avons travaillé en Arménie à déterminer la teneur en tanins du raisin en fonction du régime hydrique et nous avons établi que dans les pièces de vigne non arrosées leur teneur dans le moût et le vin était plus élevée que dans celles qui l'étaient.

La quantité de substances colorantes augmente peu à peu en fonction du mûrissement du raisin et atteint pour le Cabernet 2,5 à 2,8 p. 100 du poids de la peau verte, et pour le Sapiéravi 5 à 6 p. 100 dans la peau et 250 à 260 mg/l dans le suc de la pulpe (VALOUIKO G.G., 1973).

RIBÉREAU-GAYON (1959) a établi que l'insolation joue un grand rôle dans la synthèse des anthocyanes et que l'humidité et la température n'ont pas une influence notable. Toutefois, pour les hybrides franco-italiens, l'insolation a une importance moindre pour la synthèse des anthocyanes, car celle-ci se produit avec succès dans la vigne même par faible insolation.

Si on compare la variation de teneur en substances colorantes et en tanins pendant la période de maturation des variétés rouges, on peut établir que durant la période de maturation, la quantité de substances colorantes s'accroît brusque-

TABLEAU 2

Réserve technologique de substances colorantes et de tanins du raisin

Cépage	Année de la vendange	Lieu de croissance	Réserve technologique	
			de substances colorantes mg/l	de tanins (d'après Lœwenthal g/l)
Sapiéravi	1965	Crimée	2 166	4,2
Sapiéravi	1966	Crimée	1 570	4,2
Sapiéravi	1968	Crimée	1 450	5,45
Sapiéravi	var. s/5 ans	Crimée	1 500 à 2 300	3,9 à 5,5
Cabernet.	1965	Crimée	1 462	2,6
Sauvignon	1966	Crimée	870	2,2
Sauvignon	1968	Crimée	908	3,9
Sauvignon	1968	Crimée	900	3,1
Sauvignon	moy. s/5 ans	Kouban	600 à 650	3,1
Muscat rosé	1965	Crimée	404	1,5
Muscat rosé	1966	Crimée	234	1,35
Matrassa.	moy. s/5 ans	Crimée	1 100 à 1 300	1,8 à 2,2
Kakhet	1965	Arménie	487	2,6
Kakhet	1966	Arménie	385	2,7
Kakhet	1967	Arménie	648	2,65

ment, alors que celle des tanins diminue. A la fin de la maturation on observe une certaine diminution de la quantité d'anthocyanes, car les substances colorantes sont partiellement détruites quand les grains sont trop mûrs.

La réserve technologique de substances colorantes et de tanins qui peut passer dans le vin peut être déterminée dans le moût quand on a mis ce dernier en contact durant 30 min avec les pellicules à une température de 70 °C. Elle représente près de 20 p. 100 de la quantité de substances phénoliques contenues dans les grains de raisin (compte tenu du tanin des pépins). Pour sa part, la réserve technologique de substances colorantes représente près de 32 p. 100 de la teneur du raisin en anthocyanes.

La réserve technologique de substances colorantes ne doit pas être :

— inférieure à 600 mg/l pour les variétés fortement teintées (Sapiéravi, Cabernet Sauvignon, Matrassa, Khindogny, etc.),

— inférieure à 450 mg/l pour les variétés modérément teintées (Kakhet, Kabassia, Tsymlianski noir, Sérexia). Quant aux variétés faiblement colorées comme le Pinot noir, l'Asyl kara (noir), le rosé de Parkent, etc., il est recommandé de ne les utiliser que pour produire des vins rosés ou blancs.

La réserve technologique effective de substances colorantes et de tanins des différents cépages est présentée dans le tableau 2 (VALOUIKO, 1973).

En conclusion, il faut remarquer que les facteurs agrotechniques et écologiques et géographiques ont une influence considérable sur la qualité de la vendange et du futur vin. Cette influence est très complexe et multiforme. C'est pour cela que nous n'avons évoqué ici que des facteurs isolés et n'avons pas traité le problème dans toute sa complexité. Les données dont nous disposons à ce jour permettent cependant d'influer sur le mode de culture de la vigne dans le but d'améliorer la qualité de la vendange et du vin.

Summary

Vineyards and wines of the U.S.S.R.

The vineyards of the U.S.S.R. are dispersed among the most varied geographical conditions. The wines themselves vary from region to region.

Wine produced frome vines must be considered as reflecting the complex comprised of the vine variety, ecological and geographical factors, cultivation techniques, the technology of vinification, etc.

The cultivation, ecological and geographical factors considerably influence the quality of the harvest and the wine. This influence is diverse and very complex. For this reason until present studies have only indicated individual factors leaving the problem in its entirety as yet unanalysed.

Key-words: *Vineyards of the U.S.S.R. — Grape varieties — Ecology — Geography — Wine types — Technology.*

Références bibliographiques

AKIMTSEV V. V., 1946. Le sol et le vin, *Vinodélié i vinograd. SSSR*, **6**, 7-14.

AROUTIOUNIAN A. S., DJAMPOLADIAN L. M., SAMVELIAN A. M., KHATCHATRIAN A. L., 1960. L'amendement des vignobles comme moyen d'élever la qualité du vin, *Vinodélié i vinograd. SSSR*, **3**, 24-27.

DATOUNACHVILI E. N., 1959. Étude des huiles essentielles de quelques cépages, Thèse ès Sciences Techniques, Moscou.

FROLOV-BAGRILEIEV A. M., TROITSKII E. P., 1950. Importance des oligo-éléments dans la biochimie du raisin et du vin. Tome 3, Académie des Sciences de l'URSS, *Édition de l'AN SSSR*, Moscou-Léningrad, p. 53-56.

GOLOFRIGUA P. I., SOUTATINOV I. A., 1966. Quelques facteurs influant sur l'accumulation des substances colorantes dans les grains, *Vinodélié i vinograd. SSSR*, 4, 29-32.

KALOUGUINA G. I., 1959. Les vins de table de Moldavie et les perspectives des vins de table de marque, *in Matérialy vsiésoyouznoï naoutcho-tekhnitcheskoï konférentsii po ousoverchenstvovaniou tekhnologuii stolovykh vin* (Conférence scientifico-Technique de l'URSS pour l'amélioration de la technologie des vins de table), Tbilissi, p. 91-98.

KOROTKIEVITCH A. V., GAIVORONSKAIA Z. I., KRAVTCHENKO A. P., 1950. Les réserves en tanins du grain de raisin et les conditions de leur passage dans le vin, *in Biokhimia vinodélia*, Tome 3, Académie des Sciences de l'URSS, *Édition de l'AN SSSR*, Moscou-Léningrad, p. 26-42.

OUNGOURIANE P. N., 1960. Les fondements de la viniculture moldave, *in Troudy moldavskogo Niicvi* (travaux de l'Institut de vini-viticulture moldave), Tome 5, *Kartimoldovéniaské éditeur* Kichiniov.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*, *Librairie générale de l'enseignement*, Paris.

SAMVELIANE A. M., 1960. Les moyens de régulariser la composition de vin par les procédés agrotechniques de traitement des vignobles *in Troudy konférentsii po biokhimii vinodélia* (conférence sur la biochimie de la viniculture), Kartimoldovéniaské éditeur, Moscou, p. 37-44.

VALOUIKO G. G., 1969. Technologie des vins de table, Pichtchévaïa promychliénnost, Moscou.

VALOUIKO G. G., 1973. Biochimie et technologie des vins rouges, Pichtchévaïa promychliénnost, Moscou.

ZINTCHENKO V. I., 1964. Teneur maximum du moût et du vin en substances nitriques pour prévenir l'hyperacidité, *in Troudy Vnili Viv Magaratch*, Tome 13, *Pichtchévaïa promychliénnost* Moscou, p. 24-23.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 81-91.

L'alimentation en eau de la vigne et son influence sur la composition des moûts

G. SEGUIN

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II (France)

Résumé

Dans les sols établis sur les nappes alluviales de la Garonne, l'enracinement de la vigne est caractérisé par sa profondeur (jusqu'à 5 m en Médoc). Cela permet de comprendre que la vie d'un végétal comme la vigne soit possible dans des sols apparemment aussi pauvres et aussi secs.

L'alimentation en eau de la vigne est étudiée à l'aide d'un humidimètre à neutrons sur toute la profondeur exploitée par les racines. Après l'arrêt de croissance, durant la période de maturation du raisin, le rôle de la nappe phréatique et de sa frange capillaire est de plus en plus réduit; l'alimentation en eau de la vigne dépend alors de la réserve en eau utile au moment de la véraison et de la pluviosité (répartition et intensité).

A la suite de 8 années consécutives d'études sur 4 sols caractéristiques des grands crus médocains, nous avons essayé de mettre en évidence des corrélations entre la qualité de l'alimentation en eau de la vigne (ETR/ETP) et la constitution chimique des moûts. Malgré l'interférence d'autres facteurs naturels, il apparaît que la richesse en acides organiques des moûts (et notamment la teneur en acide malique) est d'autant plus grande que l'alimentation en eau de la vigne se fait dans de bonnes conditions. Concernant les teneurs en sucres réducteurs et en acide tartrique, il intervient des phénomènes de régulation qui, dans ces grands crus médocains, permettent d'obtenir un vin dont les deux principaux constituants varient dans des marges relativement étroites d'une année à l'autre.

Mots clés : *Vigne — Alimentation en eau — Moûts — Composition chimique.*

Alimentation en eau de la vigne dans les grands crus du Médoc

Les sols

Ce sont des sols siliceux, à texture grossière, plus ou moins acides suivant le taux de saturation du complexe adsorbant avec de faibles teneurs en eau utile et en éléments assimilables. Mais dans ces sols établis sur les nappes alluviales de la Garonne, l'enracinement de la vigne est caractérisé par sa profondeur (jusqu'à

5 m en Médoc où elle est très souvent limitée par la plus ou moins grande proximité de la nappe phréatique) et par une répartition verticale des racines très inégale suivant les propriétés chimiques et physiques du sol. Il est donc nécessaire d'étudier la nutrition minérale et l'alimentation en eau de la vigne sur toute la profondeur exploitée par les racines : cela permet de comprendre, entre autres choses, que la vie d'un végétal comme la vigne soit possible dans des sols apparemment aussi pauvres et aussi secs.

A titre d'exemple, on trouvera dans la figure ci-dessous les principales caractéristiques d'un des sols étudiés. Grâce à l'enracinement profond (500 cm), les quantités totales d'éléments assimilables se trouvant dans la zone exploitée par les racines sont beaucoup plus importantes que ce que l'on pourrait supposer à partir d'analyses trop superficielles. Néanmoins la nutrition minérale se fait dans de mauvaises conditions car un certain nombre de facteurs limitants interviennent ici (forte acidité, carence en magnésium aggravée par l'antagonisme du potassium, pauvreté en azote qui reste localisé en surface) si bien que les rendements sont toujours faibles sur ce type de terroir.

Mesure de l'humidité des sols

L'alimentation en eau de la vigne est étudiée à l'aide d'un humidimètre à neutrons qui permet d'établir des profils hydriques (fig. *a*) donnant, en fonction de la profondeur, les pourcentages d'humidité volumique du sol (l'humidité volumique correspond à l'humidité pondérale multipliée par la densité apparente du sol sec). Le principe de cet appareil repose sur le ralentissement des neutrons par l'hydrogène, notamment par l'hydrogène de l'eau : d'une mesure à l'autre, les variations du flux de neutrons thermiques sont proportionnelles aux variations de la teneur en eau du sol.

Cet appareil présente de nombreux avantages : les mesures étant effectuées dans un tube placé en permanence dans le sol, il permet de déterminer l'humidité jusqu'à de grandes profondeurs, directement sur le sol en place, très rapidement, aussi fréquemment et aussi longtemps qu'on le désire, toujours aux mêmes niveaux et sans perturbation du sol et du système racinaire des végétaux. Comme les résultats sont exprimés en humidité volumique, il est possible d'établir directement des bilans hydriques sans qu'il soit nécessaire de connaître la densité apparente du sol en place (Andrieux *et al.*, 1962).

Alimentation en eau de la vigne avant la véraison du raisin

Les études poursuivies de 1966 à 1973 (Seguin, 1969, 1970, 1971, 1973) ont permis de préciser le mode d'alimentation en eau de la vigne dans ces sols où, malgré la profondeur, les réserves en eau utile sont relativement limitées (comme la densité apparente de ces sols gravelo-sableux est comprise entre 1,8 et 2 les teneurs en eau de la figure *a*, sont environ 2 fois plus élevées que si elles étaient exprimées en humidité pondérale). Jusqu'au début du mois d'août, alors que la vigne est en pleine croissance, les radicelles se développent dans la zone d'abaissement de la nappe phréatique. Elles absorbent l'eau capillaire suspendue dans les couches supérieures du sol, cette eau étant plus ou moins réapprovisionnée par les pluies; elles puisent également l'eau laissée dans le sol par la nappe phréatique tandis qu'elle s'abaisse au cours du printemps et de l'été; elles disposent enfin

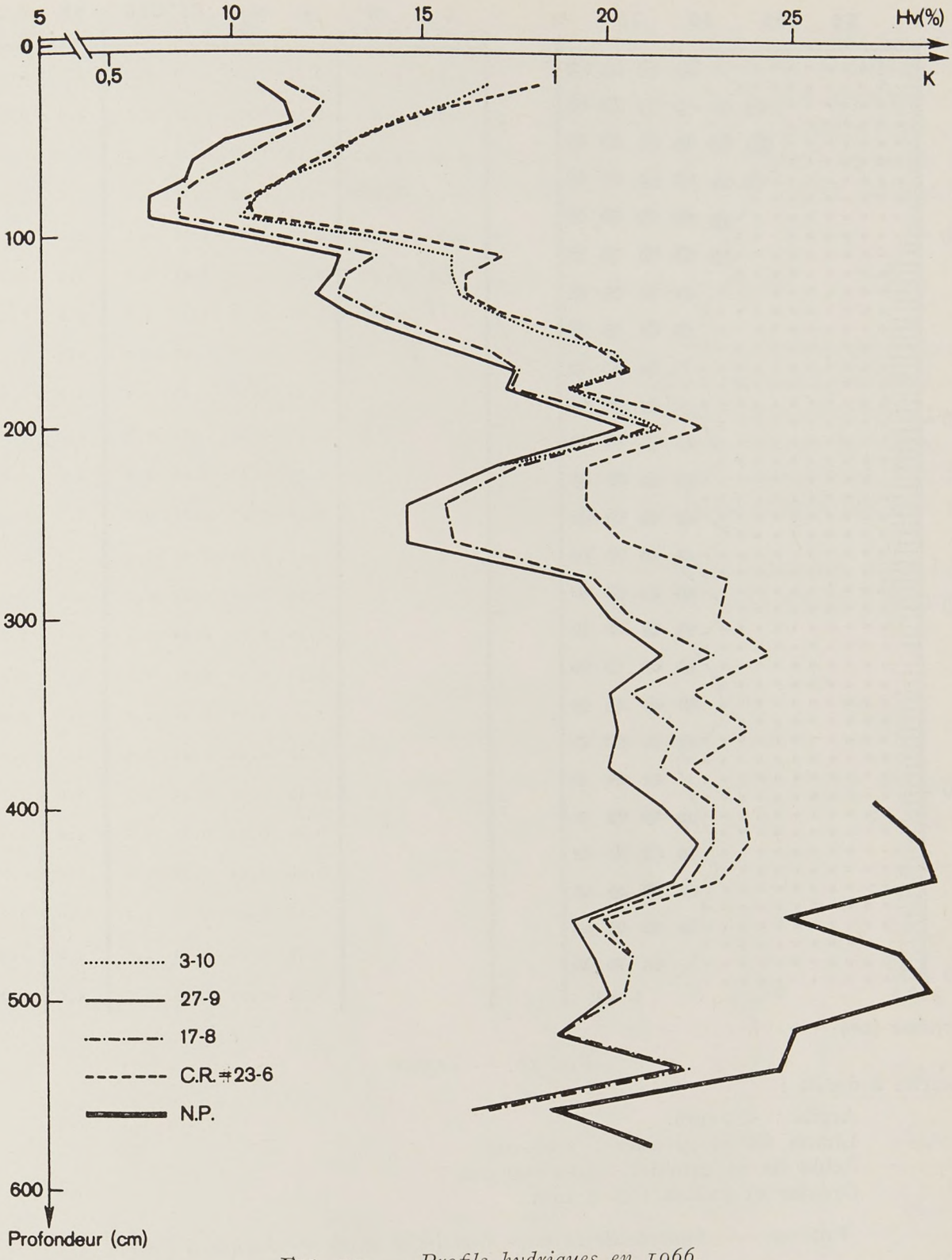
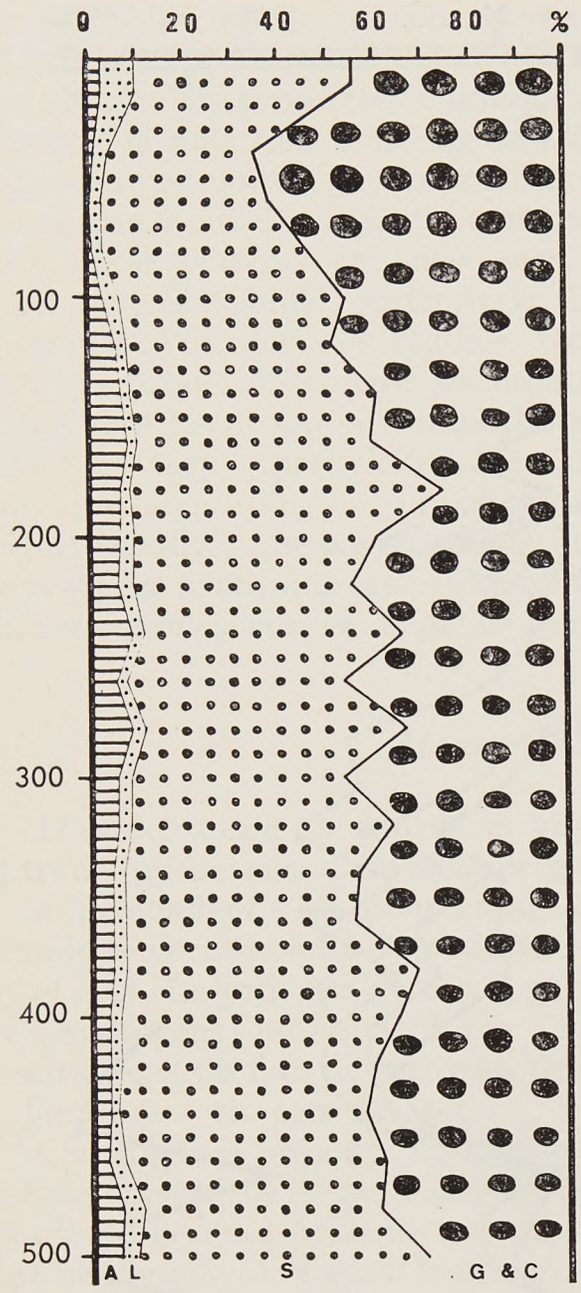


FIG. 1a. — *Profils hydriques en 1966.*

CR : capacité de rétention.
NP : nappe phréatique.
Après une période de forte pluviosité, le profil hydrique du 23 juin était voisin de celui correspondant à la capacité de rétention.

d'une eau facilement utilisable qu'elles peuvent absorber à la limite supérieure de la frange capillaire (qui est une zone suffisamment aérée puisque la teneur en eau y est égale à la capacité de rétention). Pendant la première partie du cycle végétatif, l'alimentation en eau des vignes à enracinement profond se fait toujours dans de bonnes conditions, même pendant les périodes prolongées de sécheresse.



b

C (p. 100)	N (p. 100)	K^+	Mg^{++} (mEq	Ca^{++} p. 100	CEC g.)	pH	P_2O_5 (p. 100)
0,85	0,070	0,27	0,07	0,59	4,6	4,6	0,040
0,39	0,035	0,14	0,04	0,28	2,7	4,9	0,050
0,20	0,022	0,12	0,09	0,21	2,2	5,0	0,034
0,11	0,014	0,11	0,09	0,28	1,8	5,1	0,025
0,19	0,017	0,27	0,05	1,18	3,5	5,2	0,025
0,14	0,011	0,21	0,11	1,02	3,2	5,1	0,019
0,12	0,011	0,27	0,13	1,25	4,0	5,1	0,019
		0,14	0,07	0,69	3,0	4,9	0,013
		0,14	0,10	0,49	2,5	4,8	0,014
		0,15	0,11	0,53	2,7	4,7	0,016
		0,15	0,11	0,49	2,9	4,6	0,006
		0,18	0,07	0,54	3,2	4,7	0,009
		0,17	0,05	0,43	3,2	4,7	0,006
		0,24	0,11	0,49	3,0	4,7	0,005
		0,15	0,07	0,49	3,1	4,7	0,005
		0,13	0,01	0,43	2,6	4,7	0,005
		0,21	0,04	0,38	2,5	4,7	0,004
		0,30	0,13	0,44	2,5	4,7	0,004
		0,40	0,05	0,59	3,2	4,6	0,004
		0,46	0,03	0,33	2,3	4,6	0,005
		0,36	0,13	0,39	1,8	4,6	0,005
		0,49	0,07	0,53	2,2	4,6	0,005
		0,46	0,13	0,59	2,7	4,6	0,004
		0,43	0,07	0,51	2,2	4,6	0,004

c

FIG. 1*b*. — *Texture.*

de gauche à droite :

Argile : < 2 µm.
Limon fin et grossier : 2-50 µm.
Sable fin et grossier : 50-2 000 µm.
Gravier et caillou : > 2 mm.

FIG. 1*c*. — *Analyse de la terre fine* (< 2 mm) — *Séchée à l'air.*

Alimentation en eau de la vigne durant la maturation du raisin

Généralement, à partir du mois d'août (début de l'aoûtement de la vigne et de la véraison du raisin), la croissance de la vigne, s'arrête. L'abaissement de la nappe phréatique qui se poursuit n'est plus compensé par une poussée correspondante des radicelles (des forages profonds ont montré qu'elles ne descendent pas plus bas que le niveau où se trouve la partie supérieure de la frange capillaire au début de la véraison). Le rôle de la nappe phréatique et de sa frange capillaire

est donc de plus en plus réduit (on notera sur la figure *a* que la teneur en eau ne varie plus au-dessous de 500 cm entre le 17 août et le 27 septembre). L'alimentation en eau de la vigne dépend alors de la réserve en eau utile (liée à la teneur en eau du sol et à la profondeur exploitée par les racines), du potentiel capillaire (qui représente l'énergie avec laquelle l'eau est retenue par les micropores) et enfin de la pluviosité (répartition et intensité); elle sera plus ou moins bonne suivant les années.

Régulation de l'alimentation en eau de la vigne

Compte tenu de ce qui précède et notamment de la profondeur de sol exploitée par les racines, on comprend que les vieilles vignes, à enracinement profond souffrent assez peu de la sécheresse, même pendant la période de maturation où la nappe phréatique ne joue plus aucun rôle dans l'alimentation en eau de la vigne. Par contre, les plants à enracinement superficiel, notamment les plus jeunes, souffrent du manque d'eau lorsque les mois de juin et juillet sont caractérisés par une forte aridité.

Inversement, lorsque les précipitations sont particulièrement abondantes comme en 1968 et 1969 (tabl. I), elles sont peu sensibles aux excès d'humidité.

TABLEAU I

Conditions climatiques moyennes durant la maturation du raisin.

	Tm. Max.	Tm. Min.	T. Moy.	Pluviosité
1966 17-VIII — 21-IX	24,8	11,9	18,35	24,4
1967 17-VIII — 21-IX	25,0	11,0	18,0	42,2
1968 26-VIII — 23-IX	22,2	12,7	17,45	264,2
1969 26-VIII — 22-IX	21,4	12,8	17,10	283,0
1970 19-VIII — 21-IX	24,0	10,7	17,35	66,2
1971 18-VIII — 23-IX	25,0	11,9	18,45	76,5
1972 2-IX — 6 -X	20,7	8,8	14,75	19,7
1973 21-VIII — 25-IX	24,8	12,7	18,75	68,0

Les températures (°C) ont été relevées sous abri à 2 m du sol.
Tm Max = moyenne des températures maximales.
Tm Min = moyenne des températures minimales.
T. Moy = températures moyennes.
La pluviosité est exprimée en mm de hauteur d'eau.
Les dates de demi-véraison (moyenne) et du début des vendanges sont indiquées sous les années.

Ces sols de grands crus sont en effet caractérisés par une perméabilité remarquablement élevée; moins de 24 heures après de fortes pluies, la teneur en eau du sol est voisine de la capacité de rétention; on observe un très léger excès d'eau libre en profondeur mais qui est loin d'atteindre la saturation complète définie par le profil hydrique de la nappe phréatique (SEGUIN, 1969, 1970). Il faut ajouter que, grâce à la position topographique des grands crus, sur des croupes dominant la Gironde ou ses petits affluents, les eaux de drainage sont facilement évacuées.

On peut également noter qu'après de fortes précipitations (mais n'atteignant pas des valeurs aussi élevées qu'en 1968 et 1969), l'eau apportée par les pluies reste localisée dans les couches superficielles du sol (fig. *a*; profil hydrique du 3 octobre : en une semaine, les pluies ont ramené l'humidité du sol à la capacité de rétention mais sur une profondeur de 180 cm seulement). Les taux d'humidité étant plus forts, le potentiel capillaire diminue, ce qui facilite l'absorption de l'eau par les racines. Dans le cas d'un enracinement superficiel, toutes les racines se trouvent dans la zone humectée par la pluie : l'absorption d'eau est brutale et importante. Dans les sols à enracinement profond, les racines se répartissent plus ou moins inégalement sur toute la hauteur du profil si bien que la densité des radicelles (et par conséquent les surfaces absorbantes) se trouvant dans la couche superficielle humectée par la pluie est beaucoup plus faible que dans le cas précédent : l'absorption d'eau y est limitée et surtout très progressive. Cette absorption est également réduite dans les couches profondes plus sèches car l'eau y est retenue d'une manière plus énergique. En définitive, il a été démontré par des déterminations chiffrées que l'évapotranspiration réelle après une pluie est nettement plus faible dans les sols perméables à enracinement profond (SEGUIN, 1970). En plus de cet effet régulateur qui est un caractère essentiel des grands crus médocains, cette particularité présente l'avantage de limiter l'afflux d'eau dans les baies et leur éclatement qui est généralement la cause de leur invasion par la pourriture grise. D'une manière générale, les pourcentages de grains pourris sont d'autant plus faibles que l'enracinement de la vigne est profond (SEGUIN, 1969, SEGUIN et COMPAGNON, 1970).

Tous ces phénomènes limitant les effets d'une forte sécheresse comme ceux d'une pluviosité excessive, on comprend que le vin produit soit encore de bonne qualité lorsque l'été est caractérisé par des conditions climatiques extrêmes.

Influence de l'alimentation en eau de la vigne sur la maturation du raisin; techniques d'études et résultats

Les études ont été faites, à Cantenac et Saint-Julien, sur 4 sols caractéristiques des grands crus médocains dont la profondeur d'enracinement varie de 100 cm à 500 cm. Sur chacun des sols, les grains de raisins (Merlot noir) ont été prélevés régulièrement (toutes les semaines à partir de la demi-véraison), selon une technique qui permet d'obtenir un échantillon représentatif de la population (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1960).

La composition chimique des jus de raisins, indiquée dans le tableau 2, correspond à la valeur moyenne des résultats obtenus à partir des baies récoltées au début des vendanges (et le même jour), sur chacun des sols.

La durée de maturation (nombre de jours de la demi-véraison au début des vendanges) a varié, suivant les années, de 33 à 36 jours, à l'exception de 1968 (28 jours) et de 1969 (27 jours) où le Merlot a été vendangé prématurément, en

TABLEAU 2

Qualité de l'alimentation en eau de la vigne et constitution chimique des jus de raisins au début des vendanges (Merlot noir)

	$\frac{ETR}{ETP} \cdot 100$ (p. 100)	Sucres réducteurs (g/l)	Acide tartrique (mEq/l)	Acide malique (mEq/l)	AT + AM (mEq/l)	$\frac{AM}{AT}$
1966	42	200	99	19	118	0,19
1973	69	198	113	14	127	0,12
1971	73	212	110	20	130	0,18
1967	77	202	97	38	135	0,39
1970	86	203	106	33	139	0,31
1972	90	209	114	57	171	0,50
r			0,47	0,69	0,79	0,65
P			0,3-0,4	0,1-0,2	0,05-0,1	0,1-0,2
1968		167	100	42	142	0,42
1969		181	128	40	168	0,31

(*r*) = coefficient de corrélation; (P) = seuil de probabilité (STUDENT-FISHER). L'analyse statistique ne porte que sur les 6 premières années.

raison d'une attaque importante de pourriture grise, alors qu'il n'avait pas atteint un degré suffisant de maturité.

Ces deux années ayant été caractérisées par une pluviosité estivale anormalement élevée (tabl. 1), l'alimentation en eau de la vigne a dû se faire dans de bonnes conditions mais l'évapotranspiration réelle n'a pas été chiffrée avec précision car une partie de l'eau de pluie a rejoint les nappes phréatiques, échappant ainsi à notre contrôle. Les résultats concernant ces deux années ont été indiqués à part dans le tableau 2 et n'ont pas été pris en compte lors de l'analyse statistique.

Les différentes années ont été classées suivant la « qualité » de l'alimentation en eau de la vigne qui est appréciée par le pourcentage de l'évapotranspiration réelle (E.T.R.) par rapport à l'évapotranspiration potentielle (E.T.P.). L'E.T.P. a été calculée par la formule de THORNTHWAITE dans laquelle seule la température de l'air est prise explicitement en compte; cette température a été relevée dans des abris météorologiques installés à proximité des points d'étude. L'évapotranspiration réelle a été déterminée à l'aide des profils hydriques (la quantité d'eau perdue ou gagnée par le sol est proportionnelle à la surface comprise entre deux profils hydriques). Pour établir les bilans hydriques, il faut tenir compte de la pluviosité locale (mesurée avec un pluviomètre).

La formule de THORNTHWAITE sous-estime parfois les valeurs de l'E.T.P., notamment les jours de vent et ceux où l'humidité relative de l'air est basse, si bien que les pourcentages de E.T.R. par rapport à E.T.P., indiqués dans le tableau 2 sont sans doute plus élevés qu'ils ne l'ont été réellement; cela permet néanmoins de comparer les années entre elles. Ces pourcentages représentent une valeur moyenne calculée sur toute la durée de maturation; ils peuvent donc correspondre, comme en 1970, à des alternances de mauvaise et de très bonne alimentation en eau. On pourra trouver une analyse détaillée de ces résultats dans diverses publications (SEGUIN, 1969, 1970, 1971, 1973).

Remarque : il est évident que d'autres facteurs (températures, ensoleillement, richesse chimique du sol, etc...) interviennent dans la maturation du raisin mais, pour cette étude, seule l'influence de l'alimentation en eau de la vigne sera envisagée, dans la mesure où il est possible de la considérer indépendamment des autres facteurs naturels.

Influence de l'alimentation en eau de la vigne sur la teneur en sucres réducteurs des jus de raisins

On sait (I.N.R.A., 1964) que la photosynthèse dépend, pour une très grande part, de l'alimentation en eau des végétaux. Si le débit d'eau que le « système sol-plante » est capable d'évapotranspirer est insuffisant pour satisfaire la demande climatique (évapotranspiration potentielle), les stomates se ferment plus ou moins, ce qui permet au végétal de réduire sa transpiration et de conserver une teneur en eau compatible avec la vie. Mais lorsque les stomates sont fermés, le gaz carbonique ne pénètre plus dans les feuilles et la photosynthèse s'arrête : la production des glucides est liée à la qualité de l'alimentation en eau.

Il est donc surprenant de constater (tabl. 2) que la teneur en sucres réducteurs des jus de raisins varie peu d'une année à l'autre ($\pm$ 4 p. 100) et cela pour des durées de maturation à peu près semblables. Mais les mesures de rendements que nous avons faites confirment cette théorie : les quantités de sucres produites par hectare dépendent, pour une part, de l'alimentation en eau de la vigne, sans qu'il y ait toutefois une bonne corrélation en raison de l'imbrication de nombreux autres facteurs (gel, coulure, millerandage, ensoleillement, températures, etc...).

Si l'on considère des années comparables où, durant la maturation du raisin, les sommes des températures moyennes et des durées d'ensoleillement ont été semblables (écarts inférieurs à 2 p. 100), on constate qu'en 1966 (année de mauvaise alimentation en eau) et en 1967 (année de bonne alimentation en eau) les teneurs en sucres des jus de raisins ont été équivalentes (tabl. 2) mais les rendements furent, en 1967, supérieurs de 30 p. 100 à ceux de 1966.

Il existe donc des phénomènes de régulation mais dont les mécanismes sont mal connus. Il faut souligner que dans d'autres régions viticoles et notamment dans celles où l'on produit des vins de consommation courante, les teneurs en sucres des moûts varient dans de larges proportions suivant les années.

On notera que, dans le cadre de cette étude, les baies ont été prélevées au tout début des vendanges (et quelquefois 2 ou 3 jours avant); les raisins qui restent sur souche continuent à s'enrichir en glucides si bien que les moûts entrant dans les cuves de fermentation sont encore plus sucrés que ne l'indique le tableau 2.

Influence de l'alimentation en eau de la vigne sur la teneur en acide tartrique des jus de raisins

La vigne est un des rares végétaux qui synthétisent de l'acide tartrique en grande quantité. Il a été démontré, en utilisant des molécules marquées au ^{14}C (Ribéreau-Gayon, 1966) que sa biosynthèse est généralement nulle durant la maturation du raisin puisque ne pouvant se faire que dans des organes jeunes en cours de croissance. Durant la maturation du raisin, sa teneur dans les jus diminue en raison de la dilution; mais si l'on fait abstraction du phénomène de dilution et que l'on rapporte les valeurs trouvées à 1 000 grains par exemple, on constate

que, pour des conditions climatiques normales, elles varient peu de la véraison à la maturité des baies.

PEYNAUD (1946) a observé cependant des diminutions par combustion respiratoire au cours des périodes de forte chaleur et, inversement, des apports à la suite de pluies importantes « qui augmentent la circulation de l'eau dans la souche ». Les études que nous avons faites par la suite ont permis de préciser que ces variations dépendaient aussi de la réserve en eau utile du sol et étaient liées aux valeurs de l'E.T.R. L'hypothèse proposée pour expliquer les apports d'acide tartrique au raisin, à un moment où sa biosynthèse est en principe nulle, est que cet acide accumulé dans les racines serait transporté jusqu'aux baies par la circulation ascendante de l'eau. Il pourrait s'agir d'un phénomène continu mais qui n'apparaîtrait nettement qu'après une période de forte pluviosité.

Or, on constate dans le tableau 2 que la teneur en acide tartrique des moûts est relativement indépendante de la qualité de l'alimentation en eau (très mauvaise corrélation) et présente une certaine constance (± 9 p. 100). Ce phénomène de régulation s'explique assez facilement. Lorsque les températures sont élevées, les dégradations par combustion respiratoire sont importantes; mais si les températures sont élevées, l'E.T.P. l'est également, de même que l'E.T.R. dont la valeur est proche de celle d'E.T.P. dans la mesure où le sol est bien pourvu en eau : les apports d'acide tartrique au raisin sont alors plus importants et compensent les fortes pertes par combustion respiratoire. Inversement, si les températures sont basses, les pertes par combustion respiratoire sont limitées; mais alors l'E.T.P. est faible et l'E.T.R. également. Les apports réduits d'acide tartrique compensent les faibles pertes par combustion respiratoire. Cela permet de comprendre que les quantités d'acide tartrique contenues dans les baies varient peu de la véraison à la maturité du raisin.

Il reste à expliquer les cas extrêmes où l'on peut observer des diminutions ou des augmentations notables. Les augmentations sont quelquefois appréciables, même lorsque l'on considère les teneurs par litre de jus de raisins et cela malgré le phénomène de dilution (il ne s'agit pas ici d'une surmaturation).

Pendant une période de sécheresse, la réserve en eau utile diminue et le potentiel capillaire augmente. Par suite de la régulation stomatique, l'E.T.R. est alors très réduite et présente un déficit important par rapport à une E.T.P. élevée correspondant à de fortes températures : les pertes par combustion respiratoire sont supérieures aux apports.

Au cours d'une période de forte pluviosité, les températures sont peu élevées et les combustions respiratoires (notamment celle de l'acide tartrique) très réduites; mais la pluie rétablit dans le sol une teneur en eau voisine de la capacité de rétention si bien que l'alimentation en eau de la vigne est alors optimale. Bien que les valeurs de l'E.T.P. soient faibles, celles de l'E.T.R. sont relativement élevées puisque peu différentes de l'E.T.P. Les apports d'acide tartrique au raisin sont alors supérieurs aux pertes par combustion respiratoire.

Influence de l'alimentation en eau de la vigne sur la teneur en acide malique des jus de raisins

L'acide malique est beaucoup moins stable que l'acide tartrique et les pertes par combustion respiratoire (PEYNAUD, 1946) ou par transformation en glucides (RIBÉREAU-GAYON, 1966) l'emportent toujours sur les gains. Que l'on considère les quantités contenues dans 1 000 baies ou, à plus forte raison, la teneur dans les

jus de raisins, on constate qu'elles diminuent constamment de la véraison à la maturité du raisin.

Le tableau 2 montre que les moûts sont d'autant plus riches en acide malique que l'alimentation en eau de la vigne se fait dans de bonnes conditions mais sans qu'il y ait cependant une très bonne corrélation en raison de l'influence prépondérante des températures sur les phénomènes de combustion respiratoire.

On pourrait objecter que les années de bonne alimentation en eau sont souvent des années pluvieuses où les températures sont plutôt basses et où, par conséquent, les combustions respiratoires sont réduites.

Ce n'est pas le cas ici : il se trouve, qu'en Haut-Médoc, durant la maturation du raisin, la pluviosité a été inférieure à la normale saisonnière en 1967 (42 mm), 1970 (66 mm) et 1972 (20 mm) alors que les températures avaient été très proches de la normale en 1967 et 1970 (tabl. 1).

On peut également constater que, pour une année donnée, l'acide malique est toujours plus abondant dans les raisins récoltés sur des sols humides.

Il n'y a donc pas de phénomènes de régulation aussi marqué que pour l'acide tartrique. La biosynthèse de l'acide malique qui, à l'inverse de celle de l'acide tartrique, se poursuit durant la maturation du raisin, semble d'autant plus importante que l'alimentation en eau permet un meilleur fonctionnement de la plante.

Influence de l'alimentation en eau de la vigne sur l'acidité totale des jus de raisins

On peut voir dans le tableau 2 que la somme acide tartrique (AT) plus acide malique (AM) est d'autant plus élevée que l'alimentation en eau de la vigne se fait dans de bonnes conditions (corrélation significative au seuil de 5 p. 100). On doit cependant noter que les différences d'une année à l'autre viennent davantage de l'acide malique que de l'acide tartrique (voir rapport acide malique /acide tartrique) et que ces acides sont plus ou moins salifiés.

La qualité de l'alimentation en eau a donc des répercussions importantes sur l'acidité des moûts mais une influence plus réduite sur l'acidité du vin puisqu'il y a perte d'une fonction acide lors de la transformation de l'acide malique en acide lactique. Il est important de souligner qu'il s'agit ici de la qualité de l'alimentation en eau (et non de la pluviosité) puisque nous avons vu qu'il était possible d'avoir une bonne alimentation en eau de la vigne avec de faibles précipitations.

Méthodes analytiques

Analyses de sols :

— Analyse granulométrique : pipette Robinson et tamisage des fractions grossières.
— Carbone organique : méthode Anne.
— Azote total : méthode Kjeldahl.
— Cations métalliques échangeables : extraction à l'acétate d'ammonium neutre et normal (K^+ et Ca^{++}) et au chlorure de calcium 0,025 N (Mg^{++}).
— Capacité d'échange des cations (CEC) : méthode Metson.
— Phosphore assimilable : méthode de l'École Nationale des Eaux et Forêts.
— pH : mesuré dans l'eau avec un rapport sol /liquide = 1 /2,5.

Analyses de moûts :

— Sucres réducteurs : méthode Bertrand.
— Acide tartrique : méthode Kling-Peynaud et, pour 1973, méthode O.I.V.
— Acide malique : dosage microbiologique avec *Schizosaccharomyces*.

Summary

The water intake system of the vine and its influence on the chemical composition of the musts

In the soils extending on the alluvial substrata of the Garonne, the root system of the vine is particularly deep (as much as 5 metres in the Medoc).

This explains why a plant like the vine can develop in soils which seem so poor and so dry.

A neutron moisture meter is used to study the water intake system of the vine, down through all the layers of earth from which the roots take moisture. After growth has stopped, during the period of maturation of the grapes, the role of the water table and its capillary fringe becomes less and less important. The water intake system of the vine then depends on the reserve of water it can draw on at the time of the ripening, and on the rainfall (distribution and intensity).

After carrying on eight consecutive years of studies on four soils characteristic of the Médoc « Grands Crus », we have tried to show correlations between the quality of the water intake system of the vine (ETR/ETP) and the chemical composition of the musts. Despite the interference of other natural factors, it seems that the better the water intake conditions of the vine, the richer are the musts in organic acids (and particularly in malic acid). As far as the reducing sugars and tartaric acid contents are concerned, these seem to be naturally regulated; this makes it possible, in these Medoc " Grands Crus ", to produce a wine in which the two principal constituants are relatively constant, from one year to another.

Key-words: *Water — Intake system — Musts — Chemical composition.*

Références bibliographiques

ANDRIEUX C., BUSCARLET L., GUITTON J., MERITE B., 1962. Mesure en profondeur de la teneur en eau des sols par ralentissement des neutrons rapides, *Industries atomiques*, **3-4**, 63-70 et **5-6**, 72-80.

COMPAGNON J., 1970. Alimentation en eau de la vigne dans quelques sols des Graves. Influence sur le raisin. *Thèse Doctorat 3e Cycle*, Bordeaux.

I.N.R.A., 1964. L'eau et la production végétale, 455 p., Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

PEYNAUD E., 1946. Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. *Thèse Ingénieur-Docteur*, Bordeaux.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960. *Traité d'œnologie*, 1818 p., 2 tomes, Béranger, Paris.

RIBÉREAU-GAYON G., 1966. Étude du métabolisme des glucides, des acides organiques et des acides aminés chez *Vitis vinifera* L., 148 p., *Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques*, I.N.R.A., Paris.

SEGUIN G., 1969. L'alimentation en eau de la vigne dans des sols du Haut-Médoc., *Conn. Vigne Vin*, **2**, 93-141.

SEGUIN G., 1970. Les sols de vignobles du Haut-Médoc. Influence sur l'alimentation en eau de la vigne et sur la maturation du raisin. *Thèse Doctorat ès Sciences naturelles*, Bordeaux.

SEGUIN G., 1971. L'alimentation en eau de la vigne et la maturation du raisin en 1970 sur quelques sols typiques du Haut-Médoc, *Conn. Vigne Vin*, **3**, 293-313.

SEGUIN G., 1973. Caractères particuliers de l'alimentation en eau de la vigne en 1973 dans un sol typique du Médoc. Conséquences sur la maturation du raisin. *C.R. Acad. Sci.*, **277 D**, 2493-2496.

SEGUIN G., COMPAGNON J., 1970. Une cause du développement de la pourriture grise sur les sols gravelo-sableux du vignoble bordelais, *Con. vigne vin*, **2**, 203-214.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 93-97.

INTERVENTION

Relations entre l'alimentation en eau de la vigne et la composition des moûts dans les vignobles israéliens

C. LOINGER

Israël Wine Institute, Rehovot (Israël)

Introduction

Cette publication fait partie d'un travail de recherche en commun entre la Faculté d'Agriculture et l'Institut Israélien du Vin sur l'influence des traitements d'irrigation et de la charge (éclaircissage des grappes) sur la qualité du raisin et des vins. Ce travail a commencé en 1975 et durera au moins jusqu'à 1979 et nous donnons ici quelques résultats non publiés sur l'expérience de l'année 1975 avec du Cabernet Sauvignon greffé sur Richter 110, libres de virus (provenance Davis, Californie).

Méthodes expérimentales

Nous avons fait une expérience bifactorielle dans laquelle ont été introduits 3 différents niveaux de récolte pour chacun des 4 différents traitements d'irrigation effectués (système goutte à goutte). La diminution de la récolte a été obtenue par l'éclaircissage moyen et intensif des grappes.

Dans les traitements A et B on a irrigué une fois par semaine jusqu'à la vendange avec réduction à moitié au mois d'août pour B. Dans les traitements C et D on a irrigué une fois tous les 15 jours (avec une quantité journalière calculée inférieure à A et B) jusqu'à la vendange avec une réduction de 1/3 au mois d'août pour D (tabl. 1).

Dans tous les cas il a été fait 4 répétitions, avec 12 ceps pour chaque répétition, et les résultats mentionnés sont toujours la moyenne des répétitions, date des vendanges incluse. Tous les résultats ont été analysés statistiquement.

TABLEAU I

Quantité mensuelle d'eau d'irrigation (m^3/dounam) selon les différents traitements*

Mois	A	B	C	D
Avril	40	40	40	40
Mai	66	66	48	48
Juin	92	92	56	56
Juillet	92	92	56	56
Août	92	46	56	34
Total	382	336	256	234
Après récolte	40	40	40	40

(*) Dounam $= \frac{1}{10}$ ha.

Résultats et discussions

Tableaux 2 à 5 : Les raisins des parcelles éclaircies ont généralement mûri plus vite et on a atteint un degré uniforme de maturité pour toutes les parcelles (22 à 23 degrés Brix pour les moûts, 12 à 12,5 degrés d'alcool pour les vins) en retardant de façon adéquate, la date des vendanges. Ce retard a été significatif (1 semaine) dans tous les traitements A (irrigation intensive sans arrêt jusqu'à la vendange) et on a trouvé dans les vins respectifs une forte acidité volatile (en augmentation au fur et à mesure que la charge diminue), de même que pour le traitement C des parcelles à éclaircissage moyen.

L'éclaircissage a évidemment réduit la récolte, mais les différents traitements d'irrigation n'ont pas eu d'influence significative sur la charge, bien que dans 2 cas sur 3 des traitements B (réduction de l'irrigation avant les vendanges) il y a eu une légère augmentation de la récolte.

Le poids de 100 grains et le poids de leur sucre sont significativement plus élevés dans les traitements A. Dans 2 cas sur 3 de ces mêmes traitements on a trouvé moins d'acidité malique, ce qui se retrouve dans la relation Ac. malique/Ac. tartrique, sans que ces différences soient statistiquement significatives.

L'acidité totale varie en fonction des traitements d'irrigation uniquement dans les moûts provenant des parcelles non éclaircies et cette acidité est significativement plus faible que celle des moûts provenant des parcelles éclaircies. Le pH des moûts n'a pas varié probablement à cause d'une compensation des acides organiques.

On n'a pas trouvé de différence significative dans la couleur des vins (intensité et nuance) quelle que soit la charge et quel que soit le traitement d'irrigation.

Sauf pour les vins ayant une acidité volatile élevée, les notes de dégustation ont varié de 13,49 à 14,55, c'est-à-dire sans différence significative.

TABLEAU 2

Composition chimique des moûts (sans éclaircissage des grappes)

Irrigation m³/dounam	Date moyenne des vendanges	Récolte tonne/dounam	Poids de 100 grains en g	Degré Brix	g/sucre 100 grains	pH	Acidité totale g/l acide tartrique	Acide tartrique g/l	Acide malique g/l	Relation Ac. mal. / Ac. tart.
A-382	**7-9**	2,36	153	22,6	**34,5**	3,74	6,80	5,38	1,75	0,30
B-336	1-9	**2,88**	134	22,4	29,9	3,64	6,11	4,25	2,00	0,47
C-256	3-9	2,22	139	22,4	31,0	3,63	5,72	4,63	2,13	0,43
D-234	29-8	2,25	142	21,7	30,8	3,51	7,03	4,88	2,25	0,45

TABLEAU 3

Composition chimique des vins (sans éclaircissage des grappes)

Irrigation m³/dounam	Note de dégustation (0-20)	Alcool p. 100	pH	Acidité totale g/l acide tartrique	Acidité vol. g/l acide acétique	Acide tartrique g/l	Acide malique g/l	Couleur (nm)		Tanins g/l
								420 + 520	420/520	
A-382	**10,33**	12,1	3,90	5,27	**0,76**	1,75	0,63	0,55	0,76	1 138
B-336	13,92	12,2	3,79	5,28	0,44	1,63	1,25	0,65	0,73	1 169
C-256	13,71	12,7	3,77	4,74	0,46	1,88	0,50	0,58	0,74	1 219
D-234	13,73	12,0	3,85	4,85	0,55	1,88	0,50	0,52	0,75	1 281

TABLEAU 4

Composition chimique des moûts (éclaircissage intensif des grappes)

Irrigation m³/dounam	Date moyenne des vendanges	Récolte tonne/dounam	Poids de 100 grains en g	Degré Brix	g/sucre 100 grains	pH	Acidité totale g/l acide tartrique	Acide tartrique g/l	Acide malique g/l	Relation Ac. mal. / Ac. tart.
A-382	**6-9**	1,26	**155**	22,1	**34,3**	3,79	7,85	5,63	2,00	0,34
B-336	30-8	**1,53**	136	23,2	31,5	3,66	7,35	5,00	2,38	0,45
C-256	25-8	1,34	131	23,1	30,3	3,62	7,10	4,63	2,50	0,53
D-234	26-8	1,36	137	23,1	31,5	3,58	7,52	4,63	2,50	0,53

TABLEAU 5

Composition chimique des vins (éclaircissage intensif des grappes)

Irrigation m³/dounam	Note de dégustation (0-20)	Alcool p. 100	pH	Acidité totale g/l acide tartrique	Acidité vol. g/l acide acétique	Acide tartrique g/l	Acide malique g/l	Couleur (nm) 420 + 520	Couleur (nm) 420/520	Tanins g/l
A-382	**7,54**	12,14	3,94	5,32	**1,62**	1,88	0,00	0,55	0,77	1 154
B-336	14,14	12,15	3,89	4,70	0,45	2,00	0,00	0,60	0,76	1 360
C-256	14,55	12,47	3,91	4,20	0,53	1,50	0,38	0,64	0,77	1 385
D-234	13,79	12,50	3,93	4,25	0,48	1,50	0,00	0,57	0,76	1 285

Conclusion

Le traitement A (irrigation intensive sans arrêt jusqu'à la vendange) semble être le seul à affecter défavorablement et significativement la composition chimique des moûts et la qualité respective des vins. Les différences de charge n'ont pas affecté significativement la qualité des vins. Nous attribuons ces résultats spécifiques au fait que le cépage et le porte-greffe sont libres de virus.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 99-109.

Bases biologiques et agronomiques de la qualité des vendanges

J. BRANAS

École Nationale Supérieure Agronomique
Montpellier (France)

Résumé

La qualité de la vendange est le facteur principal de la qualité du vin. Ses critères agronomiques sont connus des producteurs et des spécialistes; des motifs économiques les font parfois négliger.

Les bases rationnelles nécessaires sont accessibles par l'application des données fondamentales à la viticulture comme par l'interprétation scientifique des faits viticoles.

Les faits de la viticulture ont pour origine les pratiques culturales mises au point, au cours des siècles, dans les vieux pays viticoles, en vue d'obtenir les meilleurs vins naturels; l'autre source est dans les essais au vignoble, difficiles à exécuter, mais indispensables à l'obtention de résultats numériques.

La teneur en sucres des baies est un critère de la qualité de la vendange, et de l'agrément du vin, par ses rapports avec tous les autres constituants des moûts; la qualité augmente avec la teneur en sucres dont les facteurs biologiques et agronomiques sont connus.

Le sol influence fortement la qualité de la vendange milieu dans lequel vivent les racines, plateforme qui supporte la tranche d'air occupée par le feuillage et les grappes, le sol a un rôle important de réservoir d'eau et de minéraux.

Comme réservoir d'eau, le sol agit directement sur la teneur en sucres des baies; le dessèchement est favorable; la réhumectation naturelle ou par irrigation est nuisible.

Comme réservoir de minéraux, le sol est caractérisé par l'azote et par les cations. La qualité diminue lorsque la quantité d'azote contenue dans la couche occupée par les racines est élevée et lorsqu'elle est augmentée par la fertilisation. Le rôle des cations est en rapport avec les espèces minérales dont le sol est constitué selon la formation géologique.

Finalement, la teneur en sucres la plus élevée est atteinte sur des sols à dessèchement précoce et continu jusqu'à la maturité et à faibles réserves d'azote; et la meilleure qualité, à teneur en sucres équivalente, est obtenue, pour chaque variété, sur des formations géologiques déterminées.

Mots clés : *Vendange — Vin — Qualité — Influence du sol.*

Introduction

La qualité de la vendange est considérée ici dans le cadre de la viticulture générale (variété, milieu, pratiques culturales) en excluant les effets des maladies et des parasites.

Elle est un facteur de la qualité du vin; mais les rapports de la vendange avec le vin sont influencés par l'œonologie.

L'œnologie s'intègre parfaitement dans la production, à l'égal de l'agronomie, lorsqu'elle cherche à maintenir et à exalter les caractères agréables naturels des vins; mais il n'en est plus ainsi lorsqu'elle se propose l'élaboration forcée de vins très différents avec la même vendange et, surtout, la correction artificielle des défauts suscités par des pratiques culturales inadaptées. La chaptalisation et les autres procédés d'enrichissement, la désacidification, les apports de substances exogènes contribuent au développement de ces pratiques, à la détérioration générale de la qualité, à la perte plus ou moins prononcée du caractère naturel du vin, au déséquilibre économique de la production et à la désaffection pour la consommation du vin.

L'identification des critères agronomiques de la qualité ne présente absolument aucune ambiguïté; ils relèvent de deux domaines : la variation (le cépage) et la fluctuation (milieu et pratiques culturales).

Les cépages propres à donner de bons vins sont connus depuis longtemps; et les relations de la qualité avec les caractéristiques anatomiques et morphologiques des baies et des grappes sont assez bien établies, alors que les caractéristiques physiologiques des cépages forment un domaine peu pénétré jusqu'ici. L'appréciation de la qualité du vin des cépages inconnus (nouveaux, etc...) peut être faite par des méthodes et des procédés assez sûrs et relativement simples.

Les situations naturelles (climat, sol) et les pratiques culturales (espacement, taille, fumures, etc...) qui conviennent à l'obtention de vins de qualité sont parfaitement connues des praticiens et des spécialistes.

Mais des préoccupations économiques ont conduit à rechercher la diminution du prix de revient du vin par l'augmentation des rendements grâce à la culture des vignes puissantes, vigoureuses et chargées et à l'emploi de cépages productifs. La détérioration inévitable de la qualité des vendanges est corrigée partiellement par diverses pratiques (chaptalisation, désacidification, etc...).

Ces conséquences sont niées par une partie de la viticulture moderne qui justifie ses excès par une audacieuse mise en cause des critères agronomiques de la qualité.

L'objet de cet exposé est de montrer les sources des connaissances viticoles et, en guise d'exemple, d'en faire application aux rapports de la vigne avec le sol.

Les sources

La production, ses progrès, les réglements qui la concernent reposent sur des bases scientifiques qui sont accessibles par deux voies : faire application à la viticulture des données acquises dans un domaine fondamental particulier ou partir des faits établis en viticulture pour en retrouver l'interprétation scientifique. Elles conviennent à des hommes différents.

Beaucoup de données importantes ont été apportées par des hommes de science venus à la viticulture par inclination ou pour participer à l'actualité; mais, le temps a montré que l'intégration des acquisitions scientifiques ne se fait pas sans une adaptation, et même un certain déchet, qui expliquent la réserve que manifestent parfois des praticiens éclairés et des spécialistes.

L'autre voie a été la plus empruntée, notamment par Louis Ravaz, à une époque où le même esprit pouvant acquérir la connaissance approfondie de plusieurs branches scientifiques et où le même laboratoire pouvait réunir les moyens de plusieurs disciplines. C'est devenu très difficile et contraire à la spécialisation des formations.

Il est cependant indispensable de conserver ces deux voies du progrès des connaissances parce qu'elles se complètent, se soutiennent et se contrôlent mutuellement : si la première peut aujourd'hui manifester plus de dynamisme, la synthèse agronomique, que peuvent mener à bien des ingénieurs, reste un nécessaire banc d'épreuve. Mais cette synthèse ne saurait se faire au niveau de la vulgarisation qui requiert des procédés différents.

Les faits de la viticulture sont les témoins auxquels sont confrontées les interprétations scientifiques, qu'elles y aboutissent ou qu'elles en partent; ils ont deux sources.

L'une, l'empirisme, est tout-à-fait remarquable; la viticulture en est, probablement, le meilleur exemple parce qu'elle a le privilège de la durée, celui de donner un produit qui suscite bien des remarques et celui, enfin, d'être un objet d'attention et de discussion. La durée des vignobles établis et entretenus pendant des siècles dans la même région, avec les mêmes variétés, en vue d'obtenir le même produit, en l'absence de toute modification artificielle des vendanges et du vin, a permis une lente mise au point des pratiques culturales — et œnologiques — grâce à des observations, en nombre infini, poursuivies sans interruption, dans des conditions variables d'un endroit à l'autre et d'une année à l'autre. Avec pour objectif l'obtention d'un vin dont l'agrément justifiait la consommation, les vignobles se sont constitués en France et dans les vieux pays viticoles. Cette mise au point de la viticulture antérieure au phylloxéra est une base très solide des connaissances et elle donne la clé de bien des interprétations.

L'autre, l'expérimentation — ici les essais au vignoble — a pour but de mettre en lumière, par des mesures, des faits provoqués en modifiant un ou plusieurs des facteurs de production; les caractères individuels des pieds l'interférence des années successives, l'interaction des variables mesurables sont des difficultés considérables. De plus, le nombre des variables à contrôler et la difficulté de certaines mesures compliquent encore les essais de viticulture générale (taille, fumure, irrigation, espacement, etc...).

Mesures nécessaires, par pied

— Puissance, ou expansion, ou matière sèche édifiée.
— Rendement.
— Sucres et acidité des baies.
— Dimensions et poids moyen des baies.
— Pépins et bilan floral.
— Poids et nombre des sarments.
— Charge (nombre d'yeux laissé à la taille).
— Chronologie des phénomènes végétatifs.

Le travail de l'expérimentateur est encore alourdi par la répartition des contrôles sur l'année et par leur exécution au moment voulu; il est souvent allégé en négligeant plusieurs variables ou en sacrifiant plus ou moins la probabilité des résultats.

Le nombre presque infini des faits de l'empirisme leur dispersion dans l'espace et dans le temps, s'opposent au caractère ponctuel et aléatoire des résultats expérimentaux. L'empirisme pourrait apparaître comme la source la plus riche des données les plus sûres mais, sans les résultats numériques acquis par l'expérimentation, ces données restent suspectées de subjectivité par ceux qui ne connais-

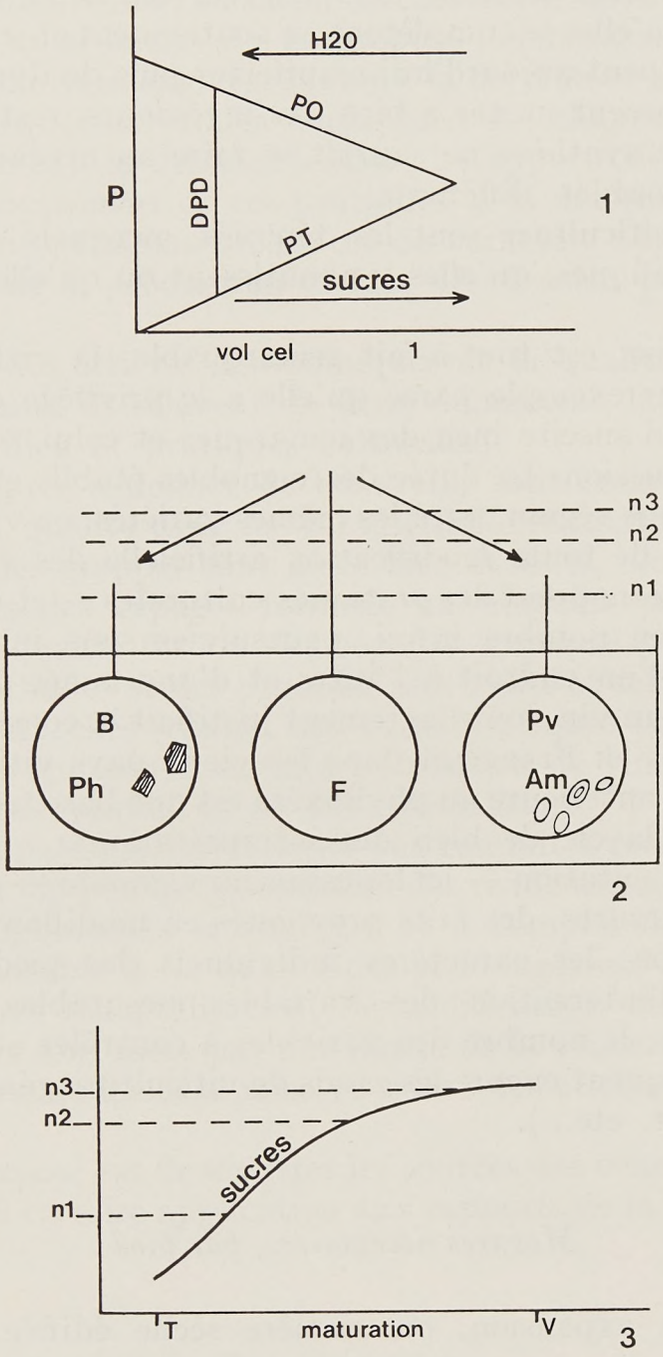


FIG. 1. — *Transport des sucres* :

1. État d'une cellule; PO pression osmotique. — Pt pression sur les parois. DPD déficit de pression de diffusion. V volume de la cellule.
2. La plante comme une batterie d'osmomètres. F feuille. Pv parties vivaces. B baies n_1, n_2, n_3 niveaux successifs d'équilibre des pressions osmotiques. Ph. composés phénoliques dans les baies. Am. amidon.
3. Augmentation de la teneur en sucres dans les baies pendant la maturation n_1, n_2, n_3 niveaux précédents.

sent pas assez la viticulture pour comprendre le sens des observations. Il y a un certain risque à négliger le secours de l'un et de l'autre.

Il reste que l'interprétation scientifique est aussi nécessaire à la justification des pratiques empiriques qu'à l'explication d'un résultat expérimental.

Qualité de la vendange et teneur en sucre des baies

La qualité de la vendange est fonction de la teneur en sucres des baies. Les termes de l'analyse sont les suivants :

— La consommation du vin, qui doit rester modérée ne se justifie que si elle procure un agrément.

— L'agrément du vin est perçu immédiatement par la dégustation; c'est une caractéristique, la finesse ou délicatesse, qui est en rapport avec l'acidité et avec des constituants des moûts autres que les sucres et les acides.

— La finesse est d'autant plus marquée que le moût est plus sucré.

— La qualité des vendanges augmente avec la teneur en sucres des moûts.

La teneur naturelle en sucres n'est pas, en elle-même, un facteur de la qualité

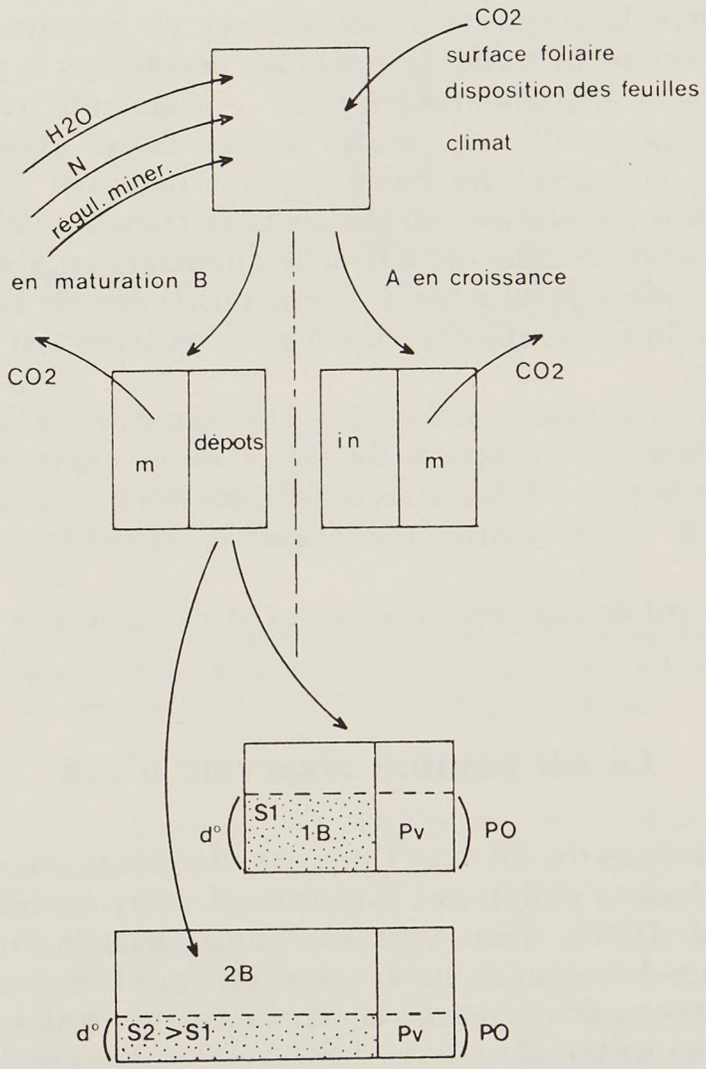


FIG. 2. — *Synthèse et redistribution des sucres* pendant la croissance (A) et pendant la maturation (B); *m* part métabolisée; en bas distribution des sucres entre les parties vivaces Pv et les baies B lorsque le volume passe de 1 B à 2 B; la pression osmotique PO et le degré diminuent; les degrés-hectolitres, S_1, S_2, augmentent.

des vendanges, mais elle en est un critère avantageux, d'une part parce qu'il est aisément accessible par l'analyse, d'autre part parce que les conditions de la synthèse, du métabolisme, du transport et du dépôt des sucres sont connues. Ces fonctions ont été souvent évoquées, récemment encore (fig. 1 et 2).

L'élévation des pressions osmotiques et du déficit de pression de diffusion (DPD), l'affaiblissement du métabolisme, la diminution du volume total des baies par pied sont favorables à la richesse en sucres et à la qualité des vendanges.

La viticulture maîtrise ces mécanismes et atteint ces objectifs en recourant à des souches faibles produisant peu, telles qu'on les obtient par une densité de plantation élevée, une faible charge des pieds, et une faible absorption d'eau et d'azote.

L'empirisme a, depuis longtemps, conduit à la même solution.

Rapports du sol et de la vigne

Les rapports du sol et de la vigne comportent des applications de ces données; ils s'inscrivent dans trois directions.

— Le sol est le milieu dans lequel vivent les racines dont la formation et les fonctions dépendent du climat du sol : température, eau, air. Des méthodes permettent de connaître la disposition des racines et l'espace qu'elles colonisent; la tranche qu'elles occupent varie de quelques décimètres à plus d'un mètre; la puissance des vignes — matière sèche formée — augmente avec l'épaisseur de la tranche (ou la profondeur du sol), toutes autres choses étant égales; la teneur maximale accessible en sucres des baies diminue dans ces conditions.

— Le sol est une plateforme qui supporte la tranche d'air dans laquelle vit le feuillage; la température dans cette couche augmente en été en se rapprochant de la surface du sol; elle dépend aussi des caractéristiques de la surface. En conséquence la proximité du sol, particulièrement pour les baies, est favorable à la qualité des vendanges.

— Enfin, le sol est un réservoir dans lequel la vigne prend l'eau et les minéraux.

Ces trois directions des rapports du sol et de la vigne ne doivent pas être confondues bien que la plupart des caractéristiques des sols les influencent souvent simultanément : ex. profondeur, hétérogénéité, structure physique, couleur, humidité, etc...

Mais le rôle du sol comme réservoir d'eau et de minéraux doit être considéré plus précisément.

Le sol comme réservoir d'eau

Les relations de l'eau du sol avec l'eau dans la plante, et, finalement, avec la teneur en sucre des baies s'établissent directement entre le déficit de pression de diffusion des cellules (DPD), d'une part, et, d'autre part la force F avec laquelle l'eau est retenue dans les espaces du sol : lorsque le sol se dessèche F augmente, ainsi que le DPD et, consécutivement la teneur en sucres des baies (fig. 3).

F augmente plus lentement par le dessèchement lorsque le sol contient plus d'eau ce qui est le cas des sols argileux lorsqu'ils sont homogènes et lorsque la nappe phréatique est rapprochée de la surface : ces sols ne sont pas favorables à la qualité.

Toute réhumectation du sol, non suivie du dessèchement, survenant naturellement ou par irrigation, pendant la période de maturation, a pour effet de réactiver le métabolisme et d'abaisser la teneur en sucres des baies; et toute réhumectation survenant pendant la croissance des baies a aussi pour effet, l'azote étant fourni, une intensification du métabolisme pour une longue période.

Bien que ces données fassent exclure l'irrigation des vignobles producteurs de vins de qualité une opposition qui a des motifs économiques, fait appel à divers

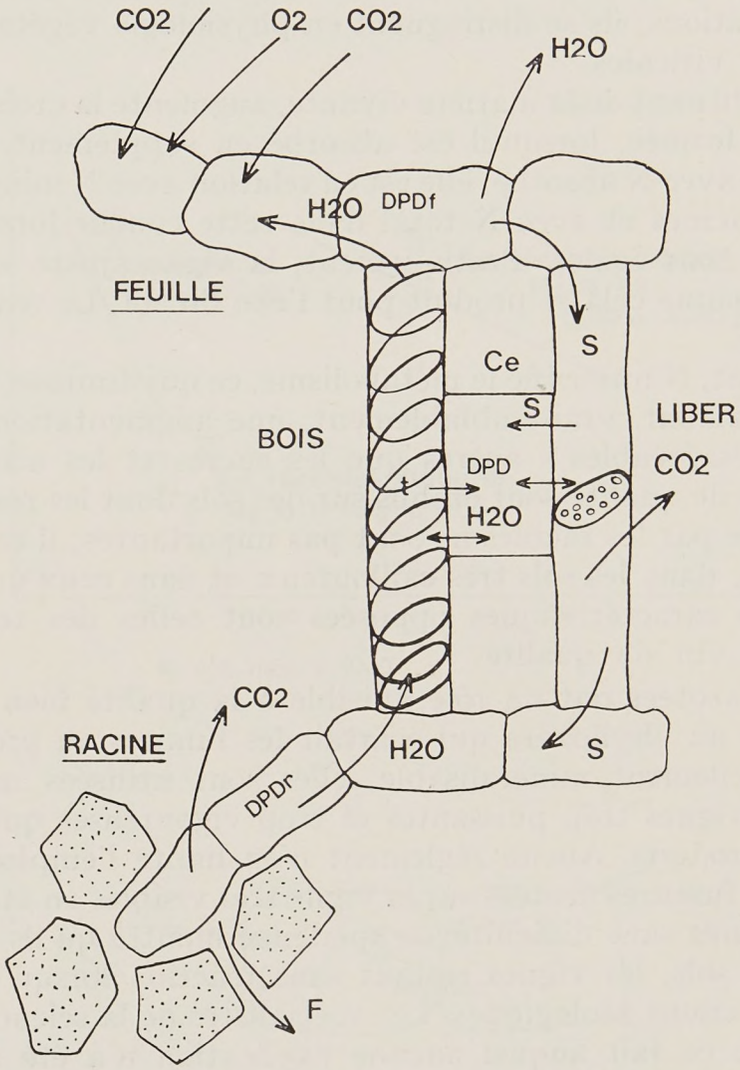


FIG. 3. — *Trajets de l'eau et des sucres.* H_2O du sol pénètre lorsque DPDr dépasse F force avec laquelle l'eau est retenue. Une cellule Ce est en équilibre pour DPD et PO avec la tension dans les vaisseaux du bois, le DPD et la PO d'équilibre général.

arguments pour justifier l'arrosage des vignes; mais si ces arguments soulignent avec raison le rôle indispensable de l'eau dans la plante, ils négligent fâcheusement l'importance du métabolisme; et, s'ils attribuent une valeur exemplaire à des résultats favorables de l'irrigation, ils omettent de préciser qu'ils ne sont accessibles que sous des climats arides ou désertiques et qu'ils ne peuvent être répétés lorsque les précipitations naturelles sont aussi importantes que dans les vignobles français.

Et il est d'autres effets de la réhumectation du sol, qui rendent l'irrigation nuisible à la qualité, la réactivation de l'absorption de N, notamment.

Le sol, réservoir de minéraux

C'est un des thèmes les plus intéressants de la viticulture parce que l'interpénétration de la science du sol et de la viticulture n'est pas toujours parfaite : des faits n'ont pas encore d'explication et des données scientifiques restent sans application.

Deux domaines sont considérés successivement : l'alimentation azotée et l'absorption des cations; ils se distinguent en physiologie végétale et, aussi bien, à travers les faits viticoles.

L'azote, constituant de la matière vivante, augmente la croissance et la qualité de matière sèche formée, lorsqu'il est absorbé en supplément. La puissance des souches augmente avec N absorbé; elle est en relation avec N minéral dans la couche occupée par les racines et avec N total dans cette couche lorsque les conditions de minéralisation sont égales. Pratiquement, la vigne ajuste son développement à N disponible, comme cela se produit pour l'eau du sol. Le rendement augmente avec la puissance.

Simultanément, N intensifie le métabolisme, ce qui diminue la teneur en sucres des baies en entraînant, vraisemblablement, une augmentation de la proportion des substances désagréables « autres que les sucres et les acides ».

Les vignobles de qualité sont établis sur des sols dont les ressources en N dans la couche colonisée par les racines ne sont pas importantes; il en est ainsi dans les sols peu profonds, dans les sols très caillouteux, et dans ceux qui se dessèchent de bonne heure. Les caractéristiques opposées sont celles des terres inadaptées à la production de vin de qualité.

Les fumures azotées ont un rôle nuisible à la qualité bien connu de la viticulture antérieure au phylloxéra qui écartait les fumiers au profit des composts, pauvres en N facilement minéralisable; elles sont utilisées aujourd'hui abusivement dans des vignes trop puissantes et trop vigoureuses qui ne peuvent pas donner de bons produits. Aucun règlement n'en limite l'emploi.

Les effets des fumures azotées sur la vigne très visibles en été comme en hiver, peuvent être mesurés sans difficulté; l'expérience montre qu'ils ne se manifestent pas dans tous les sols, les vignes restant sans réaction lorsqu'elles sont établies sur certaines formations géologiques. Les spécialistes de la science du sol n'ont pas pris conscience de ce fait auquel aucune explication n'a été apportée mais qui reste très important par ses conséquences économiques comme par son aspect scientifique en mettant en lumière l'influence des espèces minérales sur l'absorption de N.

Le rôle des cations est plus remarquable encore, au triple point de vue des effets physiologiques et économiques, des manifestations de carence et de l'aspect tout nouveau, mais qui semble très important, que prennent les problèmes relatifs aux aires de production.

L'observation des manifestations des carences permet de préciser les rapports de l'absorption des cations avec les espèces minérales ou, aussi bien, la roche mère. C'est ainsi que si les symptômes du manque de K sont bien, comme on s'y attend, d'autant plus intenses que les teneurs en K échangeable diminuent, cette relation peut disparaître lorsque l'origine géologique des sols est différente (fig. 4), le déclenchement de la carence se produisant pour des teneurs qui varient d'un type géologique de sol à l'autre : il n'est donc pas possible de se référer à une seule teneur en K pour caractériser le risque de carence. La même difficulté se retrouve vrai-

semblablement pour les autres cations essentiels. On ne sait pas si les espèces minérales qui constituent des sols différents interviennent dans les résultats de l'analyse, ou dans la pénétration du cation considéré, ou dans les deux ensemble, ni quel peut être le mécanisme de cette intervention, mais il en découle que les résultats des analyses ne sont comparables, en viticulture, que pour des sols de même origine géologique.

Le rôle des cations de la solution du sol qui pénètrent dans la plante présente plusieurs aspects; d'une part (fig. 4), ils contribuent à balancer les anions minéraux absorbés et les anions organiques synthétisés en maintenant la balance ionique

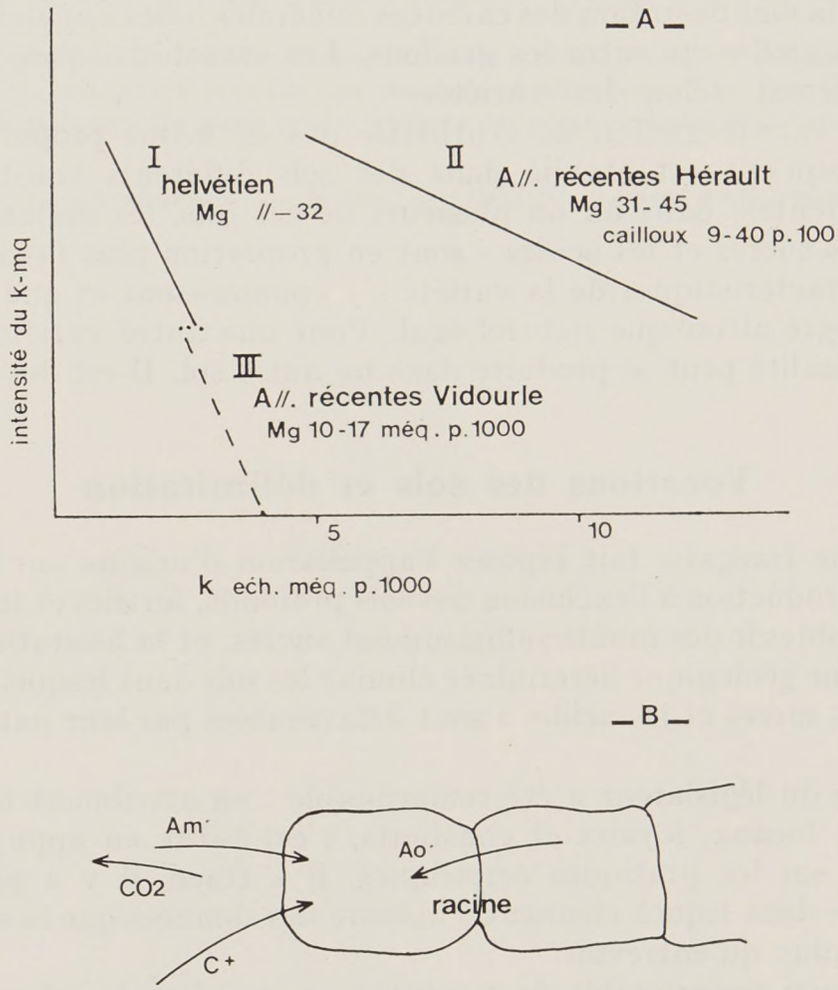


FIG. 4. — A) *Relation, pour 3 sols, de l'intensité des symptômes de la carence en potassium (K-mq) avec la teneur du sous-sol en K échangeable* (méq. p. 1 000).

B) *Équilibre ionique dans les cellules des racines.* C^+ et Am^- cations et anions minéraux de la solution du sol. Ao^- anions organiques synthétisés.

interne entre des limites correctes, concurremment avec d'autres mécanismes; d'autre part, chacun d'eux à un rôle spécifique en sollicitant la synthèse d'un acide organique donné comme c'est le cas, par exemple, du calcium et de l'acide oxalique. Par cette voie la solution du sol influence toutes les fonctions de la plante jusqu'aux synthèses les plus délicates; au rôle de l'eau et de l'azote sur la teneur en sucres et en acides des baies, se superpose donc une influence de la solution du sol sur les autres matériaux qui se rattache aux espèces minérales qui constituent le sol, selon la roche mère et la formation géologique dont il provient.

Les rapports du sol avec la qualité des vendanges et du vin s'établissent donc

de deux manières, simultanément; d'abord, comme cela est classique, les teneurs élevées en sucres ne sont obtenues que sur des vignes faibles, peu chargées prenant peu d'eau et peu d'azote; mais, en même temps, plusieurs vignes capables de donner des degrés naturels élevés produisent des vins organoleptiquement différents si elles sont établies dans des sols d'origine géologique différente.

Rôle des variétés

La pénétration et le transport des matériaux à travers les membranes cellulaires s'effectuent différemment selon les variétés comme cela se constate, notamment, à l'occasion de la manifestation des carences minérales; elles apparaissent aussi bien entre les porte-greffes qu'entre les greffons. Les caractéristiques des membranes cellulaires diffèrent selon les variétés.

La même variété greffon ne synthétise pas en même proportion les mêmes substances lorsqu'elle est établie dans des sols différents constitués d'espèces minérales différentes; dans un ou plusieurs de ces sols, les matériaux de la baie « autres que les sucres et les acides » sont en proportion plus favorable : on peut dire que les caractéristiques de la variété s'y épanouissent et que les vins y sont meilleurs, à degré alcoolique naturel égal. Pour une autre variété, cet épanouissement de la qualité peut se produire dans un autre sol. Il est des exemples.

Vocations des sols et délimitation

La doctrine française fait reposer l'appellation d'origine sur la délimitation d'une aire de production à l'exclusion des sols profonds, fertiles et frais; elle répond à la volonté d'obtenir des moûts suffisamment sucrés; et la limitation de l'aire aux sols d'une origine géologique déterminée élimine les sols dans lesquels les substances « autres que les sucres et les acides » sont défavorables par leur nature ou par leur proportion.

La sagesse du législateur a été remarquable : en attribuant force de loi aux usages anciens, locaux, loyaux et constants, c'est-à-dire en appuyant les textes règlementaires sur les pratiques empiriques, il a tracé, il y a plus d'un demi-siècle, un cadre dans lequel viennent s'inscrire des données que la science moderne ne fait guère plus qu'entrevoir.

Et il est aussi remarquable de constater que ces données viennent consolider scientifiquement la doctrine française, qui dit en peu de mots : si le Cabernet Sauvignon peut être cultivé partout dans le monde pour donner du vin de Cabernet Sauvignon, ce n'est qu'en Médoc qu'il peut donner du vin de Médoc. On est un peu étonné, peut-être, de trouver une explication scientifique à cette constatation.

Summary

Biological and agronomical data for the quality of grape harvest

Grape quality is the principal factor of wine quality. Although the agronomic criteria for quality are known by grape growers and specialists the presence of economic motives sometimes causes their neglect.

The necessary practical bases are obtainable by applying fundamental data to viticulture or by scientifically interpreting viticultural facts.

One origin of viticultural facts is the development over centuries of viticultural methods aiming to produce the best natural wines. Another source is studies in the vineyard which are difficult to carry out but indispensable in the search for statistical results.

The sugar concentration of the berries in relation to the other constituents of the must is a criteria of both the quality of the grape harvest and the charm of the wine. Quality increases with sugar content, of which the biological and agronomical factors are known.

The soil strongly influences the quality of the harvest. As the medium in which the roots live and the support for the air layer between it and the leaves and grape bunches, the soil is an important reservoir of water and minerals.

As a reservoir of water the soil in influenced directly by the sugar content of the berries; drying is favourable while rehumectation either naturally or by means of irrigation is detrimental.

As a reservoir of minerals, the soil contains nitrogen and cations. Quality falls if the level of nitrogen in the layer in which the roots are found rises and if nitrogen fertilizer is added. The role of cations depends on those minerals which are present which in turn depend on the geological formations.

Finally the highest sugar level is obtained in soils which have dried out early and remain so until grape maturity and which contain low reserves of nitrogen. The best quality with equivalent sugar levels is found for each grape variety on precise geological formations.

Key-words: *Grape harvest — Wine — Quality — Soil influence.*

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 111-122.

Le cépage et le porte-greffe facteurs importants de la qualité des vins

R. POUGET

Station de Recherches de Viticulture, I.N.R.A.
Centre de Recherches de Bordeaux, Pont-de-la-Maye (France)

Résumé

Les cépages cultivés peuvent être définis par leurs aptitudes culturales (adaptation aux conditions pédo-climatiques) et leurs caractéristiques technologiques. Ces dernières fluctuent dans des proportions variables sous l'influence non seulement des facteurs climatiques et édaphiques, mais aussi des techniques de culture.

L'amélioration des cépages par sélection clonale est basée sur des tests rigoureux qui prennent en considération à la fois le rendement et différents aspects de la qualité de vin produit (teneur en alcool et en anthocyanes, acidité, propriétés organoleptiques). Plusieurs critères de sélection sont examinés et discutés.

La création de cépages nouveaux par voie sexuée se fixe comme objectif l'amélioration des qualités culturales (adaptation au milieu, résistance aux maladies cryptogamiques etc.) et de certains caractères technologiques (teneur en arôme et en anthocyanes, richesse alcoolique, etc.). La définition des critères qualitatifs précis et objectifs par les œnologues intéresse au plus haut point les sélectionneurs de variétés nouvelles en vue de la mise en œuvre de tests de sélection précoces et efficaces.

Parmi les nombreux facteurs qui influent sur l'équilibre rendement-qualité au niveau de la plante, le porte-greffe joue un rôle prépondérant par la vigueur qu'il confère au greffon. Les variétés de porte-greffes peu vigoureuses, qui induisent un arrêt de croissance précoce favorisant la maturation des baies, doivent être recherchées pour la production de vin de très haute qualité. C'est vers cet objectif que la création de variétés nouvelles de porte-greffes est orientée.

Mots clés : *Cépages — Sélection — Critères qualitatifs — Rôle du porte-greffe.*

Introduction

L'Oenologue attache, à juste titre, une importance primordiale à la qualité de la matière première qui lui est livrée. Les facteurs qui influent sur cette qualité sont très nombreux et leur importance relative est évidemment fort variable. Si le sol, le climat et les techniques culturales jouent un rôle déterminant sur l'équilibre

entre le rendement et la qualité des produits, le cépage et le porte-greffe sont des facteurs fondamentaux qui déterminent pour une très grande part le type de vin obtenu.

Le choix des cépages cultivés est réalisé par le viticulteur en se basant sur plusieurs critères mais surtout en fonction du niveau qualitatif recherché (vins de table, vins d'appellation, etc). La qualité d'un vin est d'ailleurs souvent associée à la nature du cépage, dans l'esprit du producteur et du consommateur, qui ont tendance, dans certains cas, à négliger l'influence du milieu sur le cépage et sur sa production.

Le cépage étant habituellement greffé sur un porte-greffe, nous étudierons successivement, pour chacun de ces deux facteurs, leurs caractéristiques générales, leur influence respective sur la qualité des produits et les améliorations qui sont recherchées.

Le cépage

Les cépages cultivés dans le monde appartiennent surtout à l'espèce *Vitis vinifera* L. Les autres sont des hybrides interspécifiques dont le niveau qualitatif des produits est faible; ils sont cultivés en vue de la production de vins de consommation courante et la surface qu'ils occupent est en régression constante. Dans cet exposé, nous nous intéresserons uniquement aux cépages de *Vitis vinifera* L.

Définition des caractères des cépages

Les aptitudes des cépages cultivés sont de deux ordres : les aptitudes culturales et les aptitudes technologiques.

Les aptitudes culturales

Chaque cépage possède des caractères spécifiques : précocité de débourrement et de maturation, résistance au froid, etc. L'ensemble de ces caractères conditionne son adaptation au milieu. Les cépages de maturité tardive ont une aire d'adaptation plus restreinte que les cépages de maturité précoce, dont la possibilité de culture s'étend à presque toutes les conditions climatiques. Certains cépages ont une plasticité remarquable et sont par suite cultivés avec succès dans des conditions pédo-climatiques très diverses. C'est le cas du *Cabernet-Sauvignon*, qui se rencontre sous des climats tempérés humides (Bordelais), chauds et secs (Californie), continentaux (U.R.S.S., Bulgarie, Roumanie). D'autres cépages sont également remarquables par leur très grande plasticité : le *Chardonnay* qui produit d'excellents vins dans les milieux aussi différents que la Champagne et la région de Murfatlar (Roumanie). Le *Merlot*, le *Chenin*, le *Pinot*, la *Syrah* sont cultivés également sous des climats très variés.

Si l'adaptation des cépages aux conditions climatiques est bien connue, car elle résulte des réactions du cépage à la température ou à la photopériode, leur adaptation aux types de sols (calcaires, siliceux, etc) est encore une notion assez mal définie, en dehors de quelques observations fragmentaires qui traduisent en fait une modification de la composition du moût sous l'action des conditions édaphiques. C'est ainsi que le *Gamay*, qui produit sur les sols granitiques ou schis-

teux du Beaujolais un vin fin de grande renommée, donne un produit moins typique et plus ordinaire sur les sols argilo-calcaires du Mâconnais, dans des conditions climatiques voisines (BRANAS, 1977).

Parmi les aptitudes culturales des cépages qui intéressent l'Oenologue figure le comportement vis-à-vis de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Il existe, en effet, des différences importantes de sensibilité, certains cépages comme le *Cabernet-Sauvignon* se montrant beaucoup moins sensibles que d'autres (*Merlot*). La résistance relative au Botrytis résulte probablement plus de caractéristiques morphologiques (épaisseur de la pellicule de la baie, rafle plus ou moins lâche) que de propriétés physiologiques spécifiques (BERNARD, 1976, 1977).

Les aptitudes technologiques

Les cépages cultivés possèdent des caractéristiques technologiques particulières qui les rendent aptes à produire tel ou tel type de vin dans un milieu déterminé. Ces propriétés spécifiques sont basées sur les caractères morphologiques des grappes et des baies et sur les caractéristiques biochimiques du moût et des pellicules.

Caractères morphologiques des grappes et des baies.

La rafle des grappes possède un degré de lignification variable avec les cépages. Une lignification incomplète rend les tissus plus fragiles et peut être à l'origine de goûts « herbacés » provenant du contact entre le moût et les parties brisées de la rafle lors de l'écrasement de la vendange. La proportion de rafle, faible chez les grappes compactes et élevée chez les grappes lâches, est également un facteur dont peut dépendre le goût « herbacé ».

La texture de la pulpe de la baie varie avec les cépages. Elle peut être charnue et croquante ou juteuse. Dans le premier cas, qui caractérise essentiellement les cépages de table, une certaine quantité de substances solides d'origine cellulaire reste en contact avec le moût après le pressurage et peut communiquer un goût « herbacé » ou grossier. Par contre, les baies riches en jus donnent généralement un vin plus fin et plus agréable.

Le diamètre des baies est un facteur important à prendre en considération. Les cépages à petites baies (*Chardonnay, Pinot, Riesling, Traminer*, etc.) produisent en général un vin de meilleure qualité que les cépages à grosses baies (*Aramon, Grolleau*, etc.). Cette corrélation, surtout valable pour les cépages rouges où le rapport volume du moût/surface de la pellicule détermine pour une grande part la teneur en anthocyanes du vin, n'a pas toutefois un caractère absolu.

Caractères biochimiques du moût et des pellicules

Il est bien connu que les différents constituants du moût et des pellicules sont présents en proportions variables avec le cépage et conditionnent donc les caractères organoleptiques du vin produit. Pour CORDONNIER (1976), il serait souhaitable d'établir une « carte d'identité technologique » de chaque cépage de manière à définir ses aptitudes et ses potentialités technologiques en vue d'élaborer tel ou tel type de produit. Pour les cépages cultivés, ces potentialités sont connues globalement et permettent d'établir une hiérarchie qualitative. C'est ainsi qu'on distingue, en haut de l'échelle, des cépages nobles, aptes à produire des vins fins

(*Chardonnay, Pinot, Cabernet-Sauvignon,* etc). Dans le bas de l'échelle figurent les cépages communs utilisés pour la production des vins de qualité médiocre, sans caractère affirmé (*Aramon, Valdiguié,* etc).

Les principaux constituants chimiques et biochimiques du raisin, auxquels on peut attribuer les caractères organoleptiques qui déterminent le niveau qualitatif des cépages sont les suivants :

La teneur en sucre du moût

Certains cépages sont aptes, dans les mêmes conditions pédo-climatiques, à produire davantage de sucres que d'autres, par suite d'une activité photosynthétique de leur feuillage plus intense (*Merlot*). Cette richesse en sucre du moût supérieure, qui s'accompagne généralement d'une augmentation de la qualité du vin, doit être considérée comme un caractère physiologique très important du cépage.

L'acidité du moût

A teneur en sucre égale, l'acidité du moût peut être variable avec la nature du cépage. C'est ainsi que certaines variétés se caractérisent par une acidité très élevée (acide malique essentiellement) même en présence d'une forte richesse en sucre : c'est le cas du *Gros Manseng* et du *Petit Manseng*, dans la région de Jurançon. Kourakou (1976) indique également que le cépage grec *Assyrtikon* produit des moûts toujours acides.

Le rapport acide malique/acide tartrique, qui intéresse au plus haut point l'Oenologue, constitue une caractéristique spécifique de certains cépages.

Les composés phénoliques

La teneur des pellicules des baies en anthocyanes et en matières tannoïdes est une caractéristique fondamentale des cépages rouges. En dehors des cépages teinturiers à jus rouge dont la qualité des vins n'atteint jamais un niveau très élevé, la richesse en anthocyanes et en tanins est un caractère variétal qui conditionne pour une très grande part le type de vin produit. Jusqu'à présent, ce sont essentiellement des différences d'ordre quantitatif qui ont été mises en évidence entre les cépages. Le *Cabernet-Sauvignon* est reconnu plus riche en substances polyphénoliques (tanins) que le *Merlot*, le *Carignan* que l'*Aramon*, etc.

Depuis quelques années, à la suite des travaux de P. Ribéreau-Gayon (1968) — et de plusieurs autres chercheurs, des analyses qualitatives sont réalisées en vue de préciser la nature des anthocyanes de chaque cépage. Les travaux récents de Bisson (1977) montrent que le *Pinot* et le *Gamay* ne contiennent pas de monoglucoside du delphinidol, à la différence du *Merlot*, du *Cabernet-Sauvignon* et du *Malbec*. Le même auteur a noté également que le monoglucoside du malvidol représente 30 p. 100 des anthocyanes chez le *Pinot* et seulement 10 p. 100 chez le *Gamay*. Ces teneurs différentes ainsi que la plus grande quantité de tanins rencontrée chez le *Pinot* pourraient expliquer, d'après Bisson, l'évolution différente de la couleur des vins de ces deux cépages au cours du vieillissement.

De nombreuses recherches restent encore à entreprendre en vue de connaître avec précision la nature des anthocyanes des principaux cépages cultivés et de les relier aux caractéristiques technologiques.

Les arômes

Comme pour les substances polyphénoliques, les cépages se distinguent par la présence dans les pellicules de substances aromatiques qui contribuent à donner au vin un type particulier. Des travaux récents (CORDONNIER, 1956; TERRIER et BOIDRON, 1972; SCHAEFFER, 1976) ont montré le rôle des composés terpéniques (linalol, citrol, nérol, géraniol, etc.) dans l'arôme du *Muscat*. Il semble que l'arôme spécifique de chaque cépage résulte de différences quantitatives plutôt que qualitatives entre de très nombreux composés. Grâce à la chromatographie en phase gazeuse capillaire, qui permet de faire apparaître un beaucoup plus grand nombre de substances, il sera peut-être possible de différencier les cépages par leur aromogramme (RAPP *et al.*, 1976). Ces recherches sont d'un très grand intérêt pour la connaissance du caractère aromatique des cépages et pour l'étude de sa transmission héréditaire.

D'autres composants chimiques et biochimiques de la pellicule et du moût contribuent également à la définition de la qualité du vin produit par un cépage. Ce sont les composés azotés, les enzymes et les matières minérales. Nous ne disposons encore que de données fragmentaires sur les teneurs respectives des cépages en ces divers éléments. C'est encore un thème de recherche qu'il serait de la plus grande utilité de développer dans l'avenir.

Modifications des aptitudes technologiques

Tous ces divers constituants du raisin, dont la plupart se rencontrent en proportions variables dans les cépages, sont évidemment soumis dans les conditions de la culture à des variations de très grande amplitude. Les facteurs qui influent sur eux sont connus : porte-greffe, sol, climat, alimentation en eau, densité de plantation, système de conduite, taille, etc). Leur action, dont l'étude ne fait pas l'objet de cet exposé, peut parfois entraîner des modifications des constituants si profondes que les caractères spécifiques du cépage jouent alors un rôle très réduit ou nul. Il est évident que, dans une telle éventualité, le type du vin produit par le cépage perd son originalité et son caractère spécifique.

Les aptitudes technologiques des cépages peuvent évoluer en fonction du climat ou du milieu où ils sont cultivés. Par exemple, l'*Ugni blanc*, qui mûrit parfaitement bien dans le midi méditerranéen où il produit des vins blancs de table, donne dans le climat océanique de la région de Cognac, un vin acide et pauvre en alcool, qui convient parfaitement bien à la distillation .On rencontre ainsi de nombreux exemples de cépages dont les variations des aptitudes technologiques en fonction du milieu ou du climat sont utilisées pour l'élaboration de produits différents.

Amélioration des cépages

Les cépages de *Vitis vinifera* cultivés sont en fait des populations de clones plus ou moins hétérogènes, qui proviennent, soit de plantes différentes issues de semis, soit de mutations de bourgeons survenues au cours des multiplications végétatives successives. La variabilité du rendement et de la qualité des produits,

qui résulte de cette diversité d'ordre morphologique et physiologique, est plus ou moins étendue suivant les cépages.

A cette cause de variabilité d'origine génétique s'en ajoute souvent une autre d'origine pathologique. Les maladies à virus (court-noué, enroulement, etc.) sont, en effet, très répandues dans certains vignobles et leurs effets nocifs sur le rendement et la teneur en sucre du moût sont bien connus.

Tels qu'ils se présentent dans les conditions de la pratique viticole, les cépages cultivés n'offrent donc pas toujours toutes les aptitudes à produire un vin de qualité. Les chercheurs ont donc entrepris une amélioration du matériel végétal dans deux directions : par sélection clonale et par sélection créatrice.

La sélection clonale

En France, les travaux de sélection clonale des cépages cultivés ont été entrepris depuis une vingtaine d'années, ou parfois plus. La méthodologie de la sélection a été mise au point dans les Instituts de Recherche. Elle est basée sur la notion de clone qui désigne l'ensemble des plantes provenant d'une plante-mère par multiplication végétative (greffage ou bouturage).

Objectifs et critères de sélection

La sélection clonale est réalisée dans des parcelles de collections réunissant le plus grand nombre possible de clones d'un même cépage, provenant de prospections réalisées dans des vignobles aussi variés et éloignés que possible les uns des autres. Les observations effectuées pendant plusieurs années portent à la fois sur les caractères morphologiques et sur les aptitudes culturales.

Le premier objectif poursuivi est la recherche de clones indemnes de viroses. Cette *sélection sanitaire* réalisée par des tests d'indexage a pour but de détecter et d'éliminer les clones atteints de viroses (court-noué, enroulement, marbrure, etc.), préjudiciables au rendement et à la qualité de la production. Les clones sains retenus se caractérisent par une très grande homogénéité de vigueur et de rendement. Il est possible, grâce à un traitement de thermothérapie qui détruit les virus présents dans la plante, d'obtenir des clones sains dont les aptitudes à la production ont été restaurées. Cette méthode est appliquée couramment en France et dans d'autres pays.

Le deuxième objectif est de retenir des clones présentant les aptitudes culturales et technologiques requises pour l'obtention d'un vin de type déterminé. Cet objectif est la base même du travail de sélection clonale. L'observation et la détermination du rendement (poids de récolte par souche) et de la qualité (teneur en sucre, acidité, teneur en anthocyanes et en tanins, etc.) sont poursuivies durant une période d'au moins 5 années.

Le poids de la récolte

Il existe entre les clones d'un même cépage des différences de rendement par souche qui varient de 1 à 2 (*Cabernet-Sauvignon*) et parfois de 1 à 3 (*Merlot, Cabernet Franc*). La régularité du rendement en fonction du temps est un caractère à prendre en considération pour le choix des clones.

La richesse en sucre

A rendement par souche égal, l'aptitude à synthétiser des sucres est variable avec les clones. Des différences souvent considérables pouvant atteindre 2 degrés d'alcool sont enregistrées dans une même collection clonale. Les critères de sélection sont basés, dans une première étape, sur la relation poids de récolte-degré alcoolique. Pour cela, on reporte sur un axe de coordonnées les valeurs moyennes des 5 années de récolte (poids de récolte et degré alcoolique) pour chacun des clones de la collection (fig. 1). On trace ensuite deux droites parallèles aux axes des coordonnées et

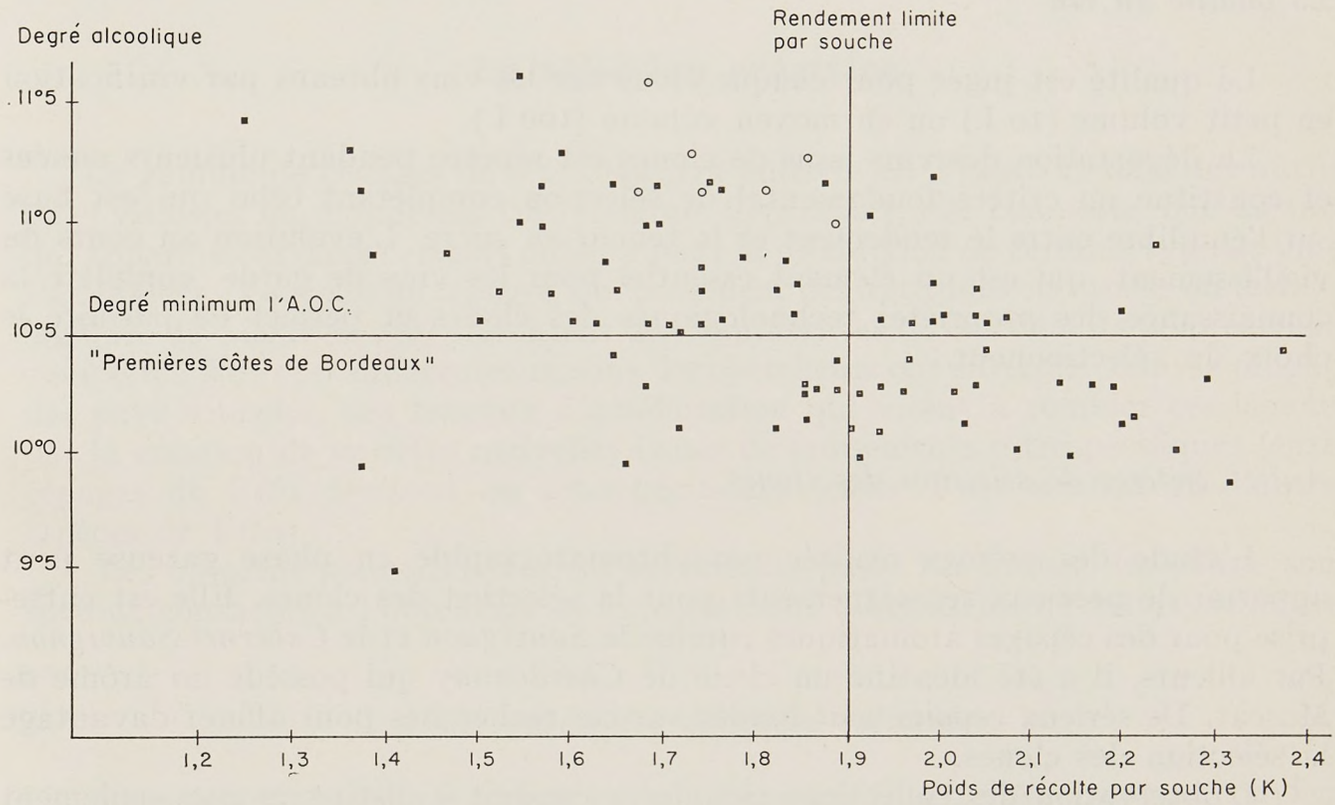


FIG. 1. — *Chaque carré représente la moyenne de 5 années de production pour un clone de la collection de* CABERNET-SAUVIGNON (*Domaine du Grand Parc, I.N.R.A., La Tresne, Gironde*). *Les clones sélectionnés sont figurés par des cercles : ils se situent dans le quadrant Nord-Ouest de la figure. Ces clones présentent le meilleur équilibre entre le rendement et la qualité. Résultats I.N.R.A., Chambre d'Agriculture de la Gironde.*

représentant, l'une le degré minimum de l'appellation contrôlée où se situe la collection d'étude, l'autre le rendement moyen par souche assurant un volume conforme à celui de l'appellation par hectare. Dans le nuage des points, ces deux droites délimitent quatre quadrants. Les clones situés dans le quadrant Nord-Ouest, qui produisent le rendement le plus proche du rendement limite avec le degré le plus élevé, sont seuls retenus par le sélectionneur. Ce sont ceux qui se rapprochent le plus de l'équilibre optimum entre le rendement et la qualité.

S'il s'agit de sélectionner des clones pour la production de vins de consommation courante, les critères du choix seront légèrement différents et les clones retenus sont ceux qui atteignent un degré assez élevé pour une production par souche plus importante.

La teneur en anthocyanes et en tanins

Pour les cépages destinés à la production de vins rouges d'appellation destinés au vieillissement (*Cabernet-Sauvignon, Merlot, Pinot,* etc.), il est indispensable de sélectionner des clones riches en composés phénoliques. L'expérience a montré l'existence de différences souvent importantes entre les clones. Les teneurs en anthocyanes des pellicules peuvent en effet varier du simple au double pour les clones de *Cabernet-Sauvignon*. Ce critère de sélection est de plus en plus pris en considération.

La qualité du vin

La qualité est jugée pour chaque clone sur les vins obtenus par vinification en petit volume (10 l.) ou en moyen volume (100 l.).

La dégustation des vins issus de clones est répétée pendant plusieurs années et constitue un critère fondamental de sélection complétant celui qui est basé sur l'équilibre entre le rendement et la teneur en sucre. L'évolution au cours du vieillissement, qui est un élément essentiel pour les vins de garde, complète la connaissance des propriétés technologiques des clones et permet de parfaire le choix du sélectionneur.

Autres critères de sélection des clones

L'étude des arômes réalisée par chromatographie en phase gazeuse peut apporter de précieux renseignements pour la sélection des clones. Elle est entreprise pour des cépages aromatiques comme le *Sauvignon* et le *Cabernet-Sauvignon*. Par ailleurs, il a été identifié un clone de *Chardonnay* qui possède un arôme de Muscat. De sérieux espoirs sont fondés sur ces recherches pour affiner davantage la sélection des clones.

L'observation des collections clonales a conduit à distinguer non seulement des différences morphologiques entre les clones (forme de la feuille, couleur du bourgeonnement, etc.) mais aussi des propriétés physiologiques particulières. C'est ainsi qu'il a été constaté que certains clones de *Sémillon* présentent des baies plus attaquées par la pourriture noble (*Botrytis cinerea*) que d'autres (LECLAIR, 1976). Cette propriété revêt un très grand intérêt pour l'élaboration des vins liquoreux du type Sauternes.

Résultats

En France, il existe, pour la plupart des cépages, de nombreux clones agréés qui sont mis à la disposition des viticulteurs. Dans un avenir proche, les nouvelles plantations ne seront réalisées qu'avec du matériel certifié d'origine clonale.

Parfois on accuse à tort les sélectionneurs de ne choisir que les clones les plus productifs sans se préoccuper de leur niveau qualitatif. Cette accusation n'est pas fondée. Il est toutefois certain que les potentialités de rendement de plantes issues de sélection clonale et indemnes de virus sont plus élevées que celles de plantes plus ou moins virosées appartenant à une population de clones aux aptitudes hétérogènes. Par ailleurs, le rendement à l'hectare d'une nouvelle parcelle établie

avec des clones sélectionnés sera, toutes choses égales par ailleurs, supérieur à celui d'une parcelle âgée comportant beaucoup de manquants. En réalité, la relation rendement-qualité doit être considérée au niveau de la plante individuelle et non au niveau de la surface. Le viticulteur, à qui le sélectionneur confie des clones sains dont les potentialités sont connues sur le plan quantitatif et qualitatif, doit savoir maîtriser la vigueur et la production de sa vigne en jouant sur tous les facteurs qu'il a à sa disposition : densité de plantation, porte-greffe, niveau de fertilisation mode de conduite, charge. L'obtention d'une qualité élevée du produit passe obligatoirement par une limitation du rendement, quelle que soit la valeur technologique du clone utilisé.

La sélection créatrice

La gamme de cépages de *Vitis vinifera* cultivés en France et dans les autres pays viticoles du monde est très étendue. Cependant, elle comporte des lacunes qui apparaissent dans certains milieux pour la production de certains type de vins. Par ailleurs, beaucoup de cépages, qui possèdent des aptitudes culturales ou technologiques de valeur élevée, présentent des insuffisances ou des défauts pour certains caractères. Pour ces différentes raisons, les chercheurs ont entrepris, dans la plupart des pays viticoles, des travaux d'amélioration qui visent à combler ces lacunes par la création de variétés nouvelles issues de croisements intraspécifiques (entre cépages de *Vitis vinifera*) ou interspécifiques (entre *Vitis vinifera* et d'autres espèces de *Vitis*).

Les objectifs poursuivis varient suivant les pays. En France, les efforts sont surtout consacrés à l'obtention de cépages issus de croisements intraspécifiques.

Amélioration des aptitudes culturales

La précocité de débourrement ou de maturation de certains cépages ne convient pas toujours dans les milieux où ils sont cultivés. *L'Ugni blanc*, en particulier, a une maturité parfois trop tardive dans la région de Cognac; un cépage possédant les mêmes qualités mais mûrissant une semaine plus tôt est recherché. Une variété nouvelle (*Portan*), plus précoce et plus riche en sucre que le *Carignan*, a été obtenue par la Station de Recherches Viticoles de Montpellier (I.N.R.A.) et peut remplacer ce cépage dans les conditions pédo-climatiques où il mûrit irrégulièrement.

Une résistance accrue à la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) est souhaitée pour la plupart des cépages. Il semble que des descendants de certains croisements (*Cabernet-Sauvignon* × *Grenache*) présentent un niveau de résistance pratique élevé (Boubals *et als*, 1976). Ce dernier aspect présente un grand intérêt pour l'Oenologue. Cet objectif de recherche est actuellement prioritaire dans les programmes d'amélioration de la Vigne en France.

Amélioration des aptitudes technologiques

Si les cépages nobles n'exigent pas d'amélioration sur le plan qualitatif, beaucoup d'autres, par contre, possèdent des aptitudes susceptibles d'être améliorées.

La richesse en sucre, liée aux potentialités photosynthétiques de la plante, doit être aussi élevée que possible. C'est cet objectif que cherchent à atteindre les sélectionneurs.

L'accroissement de la concentration en anthocyanes et en tanins est un critère de sélection essentiel pour les cépages rouges. La Station de Recherches de Viticulture (I.N.R.A.) de Bordeaux a obtenu plusieurs nouvelles variétés qui produisent un vin de très bonne qualité, riche en alcool et en matières colorantes. Elles sont destinées à remplacer les hybrides producteurs pour la production des vins de table dans la région du Sud-Ouest de la France. Ces variétés seront mises à la disposition des viticulteurs dès qu'elles seront inscrites sur la liste des variétés autorisées.

En vue de remplacer certains cépages mal adaptés (*Sémillon*) à l'élaboration de vins blancs secs dans le Sud-Ouest de la France, des variétés nouvelles à caractère aromatique ont été créées et sont actuellement en cours d'expérimentation dans différentes régions viticoles.

Ce travail d'amélioration des cépages activement poursuivi en France devrait, dans un proche avenir, aboutir à des résultats du plus grand intérêt qui contribueront à accroître le niveau qualitatif des vins de table. Pour les vins d'appellation, la législation française interdit l'emploi de cépages autres que ceux qui figurent dans le décret d'appellation. Pour être admises, les nouvelles variétés ne doivent pas modifier le type de vin produit. Ce n'est qu'à la suite d'expérimentations longues et rigoureuses que l'introduction de nouveaux cépages pourra être envisagée dans les aires d'appellation.

Le porte-greffe

Depuis l'invasion phylloxérique à la fin du siècle dernier, le greffage a été introduit en France et en Europe. Si, au début, quelques craintes ont pu être exprimées au sujet de l'influence défavorable du porte-greffe sur la qualité du vin, on s'est très rapidement aperçu qu'elles n'étaient pas justifiées et que le greffage n'altérait en aucune façon le type de vin produit par le cépage greffon.

Il a été mis en évidence par la suite que le greffage améliore dans de très nombreux cas la fructification et la maturation des baies : les cépages greffés ont un rendement et une richesse en sucres plus élevées que lorsqu'ils sont cultivés francs de pied.

Les porte-greffes confèrent au greffon une vigueur spécifique qui se traduit par un développement végétatif et, par suite, une induction florale plus ou moins importants. Cet effet du porte-greffe sur la vigueur du greffon agit comme les autres facteurs qui la conditionnent (Pouget, 1976).

Les porte-greffes vigoureux (*Rupestris du Lot, 99 R, 110 R, 140 Ru,* etc.) communiquent au greffon des potentialités de croissance élevées qui augmentent la masse foliaire et le poids de la récolte, prolongent la période de croissance des organes et, par suite, ralentissent l'accumulation des sucres dans les baies et retardent la maturation. Il en résulte une diminution du niveau qualitatif (baisse de la teneur en sucre, en composés polyphénoliques et en arômes, augmentation de l'acidité) qui traduit un déséquilibre entre le rendement et la qualité du produit.

Par contre, les porte-greffes faibles (*Riparia Gloire, 101-14,* etc.) ne communiquent au greffon qu'un développement végétatif réduit qui s'accompagne d'un poids de récolte moyen à faible. Ils induisent par suite un arrêt de croissance

précoce survenant en même temps que la véraison des baies, condition favorable à l'élaboration d'un produit de haute qualité (teneur en sucres, en composés phénoliques et en arômes élevés, acidité moyenne à faible).

Il est évident que l'obtention de vins de très haute qualité ne peut être envisagée qu'avec des porte-greffes faibles, à condition toutefois que les autres facteurs qui favorisent ce type de production soient également mis en œuvre. Les porte-greffes vigoureux doivent être réservés aux vignobles destinés à produire en grande quantité des vins de qualité moyenne ou basse. Ils devraient être exclus des vignobles producteurs d'un vin de qualité élevée.

Le porte-greffe peut être un facteur qui modifie les potentialités d'un sol. En effet, s'il est vigoureux, il contribuera à atténuer l'effet de réduction de la vigueur d'un sol moyen et pauvre. Par contre, s'il est faible, il réduit le développement que communique aux plantes un sol trop fertile. Le Viticulteur doit donc considérer le porte-greffe comme un élément régulateur essentiel dont le choix est déterminant pour l'orientation de la production vers tel ou tel niveau qualitatif.

Des recherches sont poursuivies à la Station de Recherches de Viticulture (I.N.R.A.) de Bordeaux pour obtenir de nouvelles variétés de porte-greffes résistantes à la chlorose et de vigueur faible ou moyenne.

Conclusion

Cet exposé destiné à montrer que le rôle du matériel végétal dans l'élaboration du vin revêt une importance très grande, a permis de soulever un grand nombre de problèmes dont certains restent encore à résoudre. Le Chercheur, qui s'occupe de sélection de clones ou de création de variétés nouvelles, doit nécessairement se préoccuper de définir, en plus des aptitudes culturales, les aptitudes technologiques des variétés qu'il recherche. Pour cela, une connaissance des problèmes qui se posent à l'Oenologue lui est nécessaire. Un dialogue entre les deux doit s'instaurer pour aboutir à une meilleure définition des critères de sélection. Dans ce domaine, les progrès qui seront réalisés pour identifier les constituants spécifiques des différents cépages (anthocyanes, arômes, etc.) et pour améliorer les méthodes d'analyse et les tests qualitatifs, seront de la plus grande utilité pour le Sélectionneur. Un travail considérable reste à accomplir et, plus que jamais, un rapprochement et une étroite collaboration doivent s'établir entre l'Oenologue et le Chercheur viticole pour une amélioration constante de la qualité des vins.

Summary

Vine variety and root stock as major factors of the wine quality

Cultivated varieties may be described by both their cultural aptitudes (adaption to pedoclimatic conditions) and their technological characteristics. The latter vary in differing proportions under the influence not only of climatic and edaphic factors, but also cultural techniques.

Varietal improvement by clonal selection is based upon rigorous testing which takes into account both production and different aspects of wine quality (alcoholic content, concentration of anthocyanes, acidity, organoleptic characteristics). Several selection criteria are discussed.

The development of new varieties by sexual means aims at the improvement of cultural qualities (environmental adaption, resistance to crytogamic diseases; etc.) and of certain technological characteristics (content of volatile constituants (aroma), anthocyanes and alcohol; etc.).

The definition of precise and objective qualitative criteria by winemakers concerns ultimately the selectors of new varieties, considering the early development of efficient selection tests.

The rootstock, via its effect on the scion, is the dominant factor influencing the equilibrium between production and quality. The less-vigorous rootstocks, which induce an early halt in growth of the wine which favours berry maturation must be sought for the production of very high quality wines. This is the aim of rootstock development.

Key-words: *Vine varieties — Selection — Quantitative criteria — Role of the " rootstock "*.

Références bibliographiques

BERNARD A., 1976. Résistance mécanique des baies de *Vitis vinifera* L. au *Botrytis cinerea* Pers., *France Vitic.*, **10**, 301-307.

BERNARD A., 1977. Observations histologiques sur la pellicule des baies de *Vitis vinifera* L. en relation avec *Botrytis cinerea* Pers., *France Vitic.*, **1**, 7-20.

BRANAS J., 1977. La qualité de la vendange, *Progr. Agric. Vitic.*, **5**, 139-153; **6**, 171-177.

BISSON J., 1977. Communication orale.

BOUDALS D., MUR G., BERNARD A., 1976. Méthodes pour l'obtention de variétés nouvelles de vignes résistantes au *Botrytis cinerea*, *Ve Symposium sur les Botrytis.*, Bordeaux.

CORDONNIER R., 1956. Recherches sur l'aromatisation et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur, *Ann. Technol. Agric.*, **1**, 75-110.

CORDONNIER R., 1976. Qualité de la vendange et méthodologie de la sélection viticole, *Progr. Agric. Vitic.*, **24**, 760-762; **25**, 781-784.

KOURAKOU S., 1976. Degré de maturité optimal du raisin en relation avec le type de vin à élaborer, *Progr. Agric. Vitic.*, **4**, 122-129; **5**, 159-170; **6**, 202-214.

LECLAIR Ph., 1976. Sélection clonale des cépages bordelais (exemple du *Cabernet-Sauvignon*), *IIe Symposium International sur la sélection clonale de la Vigne.* Sept. 1976, A.N.T.A.V., Le Grau du Roi (France).

LECLAIR Ph., 1976. Communication orale.

POUGET R., 1976. Obtention de nouveaux porte-greffes favorables à la qualité : la résistance à la chlorose et la maîtrise de la vigueur. *Rapport 56e Ass. Gén. O.I.V.*, Sept. 1976, Ljubljana (Yougoslavie).

RAPP A., HASTRICH H., ENGEL L., 1976. Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe der Weinbeeren, *Vitis*, **15**, 29-36.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux, 254 p., Ed. Dunod, Paris.

SCHAEFFER A., 1976. Les arômes du raisin et du vin, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **69**, 763-766.

TERRIER A., BOIDRON J. W., 1972. Identification des dérivés terpéniques dans les raisins de certaines variétés de *Vitis vinifera*. L. Techniques expérimentales, *Conn. Vigne Vin.*, **1**, 69-85; **2**, 147-160.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 123-125.

INTERVENTION

Influence de l'irrigation sur la composition en acides gras et en composés phénoliques des mérithalles des feuilles et des inflorescences de la vigne au moment de la floraison

J. MADERO-TAMARGO, G. DARNÉ et J. BOUARD

Laboratoire de physiologie végétale et Ampélologie, Université de Bordeaux I (France)

Sous l'influence de l'irrigation la vigne subit des modifications qui affectent la croissance des rameaux, le poids de la récolte et la qualité des raisins. En ce qui concerne plus précisément ce dernier point, on admet généralement qu'il se produit une diminution de la teneur en sucre des baies et une augmentation de l'acidité des moûts.

En fait, les modifications du métabolisme des pieds de vigne soumis à l'irrigation sont encore très mal connues. Les résultats que nous exposons ici concernent les conséquences de ce traitement sur la composition en acides gras et en composés phénoliques des jeunes rameaux au moment de la floraison.

Matériel et méthodes

L'expérimentation a été réalisée dans une vigne de Cabernet Sauvignon greffé sur SO_4. Deux parcelles ont été choisies en 1975 et l'une d'elles a été irriguée. La parcelle irriguée a reçu au total 70 mm d'eau, apportés en 4 fois : 15 mm le 28-VI et le 30-VI, 20 mm le 6-VII et le 15-VII.

Les prélèvements ont été effectués au moment de la floraison (10 juin) dans la parcelle irriguée et dans la parcelle témoin. Ils ont porté sur la première inflorescence, la feuille située en face de cette inflorescence et le mérithalle immédiatement sous-jacent.

Le dosage des acides gras et celui des composés phénoliques ont été effectués suivant des techniques déjà décrites en détail par ATALAY et DARNAY.

Résultats

Acides gras

— Les teneurs en acides gras totaux des mérithalles, des feuilles et des inflorescences sont toujours plus élevées dans les organes de la vigne irriguée. L'importance des différences mises en évidence varie considérablement suivant qu'il s'agit des feuilles (+ 20 p. 100), des mérithalles (+ 9 p. 100) ou des inflorescences (+ 3 p. 100).

— L'augmentation observée est due à la fois à une augmentation de l'ensemble des acides gras insaturés et saturés. Cependant, si l'on considère séparément les différents acides gras, on constate que les augmentations qu'ils subissent sont très variables et, dans le cas des inflorescences, il se produit même une légère diminution des teneurs en acide oléique et linolénique. Il y a lieu de remarquer aussi que les feuilles et les inflorescences sont caractérisées respectivement par une augmentation considérable de la teneur en acide linolénique et en acide stéarique et que dans les mérithalles la teneur en acide linolénique ne varie pratiquement pas.

— Malgré toutes les différences de teneurs observées entre les organes provenant des deux parcelles, les proportions relatives des acides gras sont restées *remarquablement identiques*. L'irrigation n'a donc entraîné *aucune modification* du rapport entre l'ensemble des acides gras insaturés et celui des acides gras saturés, ni dans les mérithalles, ni dans les feuilles, ni dans les grappes.

Composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques totaux (C.P.T.) et en leucoanthocyanes (L.A.) des mérithalles, des feuilles et des inflorescences sont modifiées sous l'influence de l'irrigation, mais de façon inégale. En effet, alors que les teneurs en C.P.T. et en L.A. des feuilles et des inflorescences de la parcelle irriguée atteignent des valeurs plus élevées, celles des mérithalles deviennent plus faibles. Ainsi, contrairement à ce que nous avons vu pour les acides gras, les trois organes considérés ici ne réagissent pas de la même façon et ces résultats s'accordent bien avec ce que l'on sait déjà des composés phénoliques de la vigne.

Dans le cas des mérithalles, étant donné les conditions de l'expérimentation, la diminution de la teneur en C.P.T. et L.A. observée ne peut être considérée que comme une conséquence de l'irrigation subie au cours du cycle végétatif précédent. Ce résultat correspond bien à ce que l'on sait sur l'influence des précipitations atmosphériques sur la synthèse des composés phénoliques dans ces organes. Il s'agit, rappelons-le, d'une influence dépressive pendant toute la période qui va de juin à septembre et c'est précisément au cours de cette période que l'irrigation a été effectuée.

Dans le cas des feuilles et des inflorescences, la différence observée, une augmentation, doit également, pour les mêmes raisons, être considérée comme une conséquence de l'irrigation. Cela signifie donc que les divers organes n'ont pas réagi de la même façon aux conditions expérimentales qui leur ont été appliquées. Une telle indépendance dans le sens des variations d'une catégorie déterminée de composés biochimiques suivant l'organe considéré avait déjà été notée par FERCHAUD en ce qui concerne précisément les composés phénoliques des grappes et des sarments de l'Ugni blanc lors de la véraison.

Conclusion

L'irrigation de la vigne telle qu'elle a été pratiquée dans cette expérimentation a entraîné des modifications dans le métabolisme des rameaux qui se sont développés l'année suivante. Il reste à préciser si cet effet, observé dès la première année au moment de la floraison, se maintient au cours du vieillissement du rameau et s'il est susceptible de s'accentuer lors des irrigations ultérieures.

Les modifications qui se sont produites diffèrent suivant la catégorie de composés biochimiques considérée et, pour une même catégorie, suivant l'organe. C'est ainsi que la teneur en acides gras des mérithalles, des feuilles et des grappes augmente, alors que celle des composés phénoliques diminue dans les mérithalles, mais subit une augmentation dans les deux autres organes.

Les variations mises en évidence dans le cas des acides gras montrent que les modifications qui se produisent sont très précises. En effet, si les proportions relatives de ces divers acides subissent des fluctuations, parfois importantes, on remarque néanmoins que le mécanisme qui règle le rapport entre l'ensemble des acides saturés et l'ensemble des acides insaturés n'est pas déréglé et reste remarquablement constant.

Enfin, il apparaît possible de relier certaines des modifications biochimiques observées à l'aspect morphologique des vignes traitées. L'augmentation de la teneur en acide linolénique des feuilles, par exemple, est concomitante d'un verdissement plus intense de ces organes et comme la présence de cet acide est liée à l'activité photosynthétique, il n'est pas étonnant que la vigueur des vignes irriguées soit plus grande.

Finalement, un ensemble de recherches plus complet, portant aussi sur les glucides et sur d'autres périodes du développement de la grappe, permettrait sans doute d'établir une relation entre les modifications du métabolisme des organes végétatifs de la vigne et la qualité des raisins.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 127-136.

La pourriture des raisins moyens de protection et influence sur les caractères des vins

L. HIDALGO

Institut National des Recherches Agronomiques
Madrid (Espagne)

Résumé

Après quelques considérations générales faisant ressortir l'importance de la pourriture du raisin, conséquence du développement de plus en plus fréquent et répandu de *Botrytis cinerea*, l'auteur étudie son étiologie et son développement, en insistant particulièrement sur les causes qui favorisent sa multiplication.

L'auteur passe en revue les moyens de prévention, les fongicides efficaces et les traitements les plus recommandables.

Enfin, il considère l'incidence de la pourriture des raisins sur les caractères des vins produits, ainsi que sur l'action pendant la fermentation du moût, des résidus des botriticides employés et l'enrichissement du sol en ces résidus.

Mots clés : *Raisins — Pourriture — Étiologie — Développement — Incidences qualitatives — Moyens de prévention.*

Introduction

Depuis 15 ou 20 ans, et particulièrement ces 10 dernières années, les attaques de pourriture grise ont été considérables et d'importance croissante. Ceci est dû à de meilleurs procédés de cultures, à l'emploi de variétés de vinifera et de porte-greffes sélectionnés plus vigoureux, à l'utilisation intensive d'engrais (surtout azotés), à une végétation luxuriante, à l'emploi de fongicides organiques sans action dépressive sur la végétation comme c'était le cas des dérivés cupriques et au manque croissant de main-d'œuvre qui empêche ou réduit les travaux en vert sur la vigne.

Étiologie

L'agent de la maladie dans sa forme parfaite est le champignon *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Funck dont la forme imparfaite conidienne est appelée *Botrytis cinerea* Pers (Deuteromycète, ordre Hifales, famille mucodinacées) et la forme sclérote *Sclerotium echinatum Fuch.* En Espagne la première forme est pratiquement inconnue et la troisième se présente rarement. Nous nous occuperons principalement de la forme conidienne et accessoirement de la forme sclérote.

Ce champignon, très répandu dans la nature, vit en saprophyte sur un grand nombre de déchets organiques mais peut devenir parasite. Il attaque divers organes verts, desséchant de nombreuses plantes dont la vigne, ce qui implique des difficultés de traitements.

Lors de la germination des spores se forme un mycelium interne plus ou moins ramifié, comme celui du mildiou, mais cloisonné et sans haustoria, s'étendant à l'intérieur des organes attaqués. Lorsqu'il atteint le milieu extérieur en détruisant le parenchyme végétal parasité, il produit des fructifications caractéristiques de forme arborescente, les conidiophores ramifiées (*facies Botrytis*) dont l'extrémité supérieure, en forme de grappe, porte les conidies avec leurs spores, petits et légèrement ovoïdes qui s'assemblent en glomérules à l'extrémité de courts pédoncules dont ils se détacheront à maturité et portant parfois des crochets avec lesquels ils adhéreront aux organes parasitables.

Au début, conidiophores et conidies sont complètement transparentes. Après 3 à 5 jours d'exposition aux conditions ambiantes, les conidiophores deviennent grisâtres en commençant par la base et les conidies prennent une teinte plus foncée. La grande quantité de fructification sur l'organe attaqué lui donne un aspect velouté grisâtre d'où le nom de pourriture grise.

A l'automne peuvent apparaître sur les feuilles et les tiges des organes de conservation ou sclérotes, constitués d'une masse enchevêtrée, blanche à l'intérieur, noire et dure à l'extérieur (*facies Sclerotium*). Les sclérotes donnent des conidiophores au printemps suivant fermant ainsi le cycle sans passer par le forme ascogène. Beaucoup moins fréquente est la formation des apothécies en forme de coupe sur un pédoncule long et flexible, à l'intérieur desquelles sont mélangées des paraphyses et des asques, ces derniers portant 8 spores ovoïdes et hyalins.

Conditions de développement

La forme conidienne *Botrytis cinerea* s'adapte aux conditions les plus variées, mais nécessite toujours un minimum d'humidité et évolue rapidement en fonction de la température.

A 35^0, les spores ne germent pas et meurent au bout de 2 jours. La température optimale paraît être 20 à 25 ^{0}C, la germination commençant à 13 ^{0}C de façon ralentie. L'activité optimale du mycélium se trouve aux environs de 20 ^{0}C; son développement peut se poursuivre jusqu'à 25^0 et s'arrête à cette température. La formation de conidies est optimale à 20 ^{0}C et s'arrête à 22 ^{0}C; elle peut commencer de façon ralentie à 15 ^{0}C.

Les conidies ont besoin pour leur germination des gouttes de pluie ou de

condensation ou, dans le cas d'attaque de la grappe de la présence du jus provenant des baies détruites par le parasite, ou par d'autres causes.

En résumé, nous retiendrons la règle des 15-15, c'est-à-dire une humidification des organes de la plante pendant au moins 15 h à une température moyenne d'au moins 15 °C.

Développement

Botrytis cinerea attaque tous les organes de la plante mais les dégâts causés aux feuilles rameaux et sarments s'ils ne sont pas trop étendus ont comparativement moins de gravité que ceux causés aux grappes, qui sont très graves.

Les baies petites et vertes y sont peu sensibles, mais lorsqu'elles commencent à accumuler du sucre, leur sensibilité ainsi que celle des pédoncules augmente rapidement. Quand le pédoncule est attaqué, l'accumulation de sucre dans les baies cesse, entraînant leur perte.

L'attaque peut se faire directement sur les baies et leur pédoncule; les spores germent à l'extérieur et traversant la cuticule développent le mycélium à l'intérieur des grains. Les dégâts se propagent d'une baie à l'autre à partir du foyer initial. La pénétration à travers la membrane cellulosique du raisin est facilitée par la cytase sécrétée par *Botrytis cinerea*. La maladie se développe beaucoup plus rapidement si les baies présentent des lésions ou des attaques de mildiou, d'oïdium et du ver de la grappe. L'attaque peut aussi se développer sous forme larvée, de la même manière que celle du mildiou. Ces deux maladies peuvent coïncider, ce qui est d'une grande gravité et provoque la désorganisation des éléments constitutifs de la grappe.

A l'approche de la maturation, si le champignon trouve des conditions d'humidité et de température favorables, il peut se développer sur des baies encore vertes, avant la véraison, pénétrant dans la pulpe du fruit et détruisant ce dernier. L'attaque des grappes mûres, de beaucoup la plus dangereuse, se manifeste d'abord par des taches circulaires violacées sur la cuticule. Ces taches augmentent en taille et en nombre jusqu'à recouvrir toute la surface en prenant une teinte grise sur le raisin blanc, pas très marquée sur le raisin rouge. Puis les baies se plissent, premier symptôme de dessèchement, et si les conditions continuent à être favorables, la pellicule se déchire et le jus s'écoule alors que le mycelium, recouvrant partiellement ou totalement la baie d'un feutrage épais, pénètre à l'intérieur. Le flétrissement continue et s'achève par un dessèchement total.

Dans les mêmes conditions mais par un processus inverse, se développe la forme larvée qui coexiste souvent avec celle du mildiou, facilement détectable par observation microscopique de la pulpe. Le mycélium du mildiou est transparent, non cloisonné et avec des haustoria. Il faut le colorer pour l'observer alors que celui de *Botrytis*, 3 ou 4 mois après le début de l'attaque est gris, cloisonné, sans hautoria, avec des cellules de dimensions plus irrégulières. Il faut remarquer que le mycélium jeune est pratiquement transparent, ce qui rend l'observation microcospique difficile, mais la présence de cloisons et l'absence d'haustoria rend la confusion impossible.

Facteurs de développement de la maladie
Mesures préventives

Un premier facteur à considérer est la variété. Les cépages les plus sensibles à *Botrytis Cinerea* sont ceux portant des grappes à grains serrés, à peau fine et ayant un feuillage abondant. Les cépages tardifs surtout ceux dont les fruits viennent à maturité vers l'équinoxe d'automne, période généralement pluvieuse, sont plus attaqués que les précoces. L'aération des grappes, variable selon qu'elles sont serrées ou lâches et le développement foliaire ont une grande influence sur la période de contamination. Les grains de raisin serrés et l'abondance du feuillage dans les zones fructifères des rameaux surtout dans le cas de variétés vigoureuses permettent l'établissement des conditions 15-15 propices à la contamination.

L'épaisseur de la pellicule peut avoir une influence sur la résistance à la pourriture grise, mais cette résistance ne paraît pas dépendre uniquement de l'épaisseur, c'est-à-dire de l'ensemble des petites cellules de la couche externe de la pellicule. Les espèces américaines : *Vitis coriacea*, *Vitis monticola*, *Vitis aestivales* et *Vitis labrusca* sont très résistantes, *Vitis rupestris* l'est moins et notre *Vitis vinifera* y est très sensible; néanmoins, la variété *Ohanes* se distingue par sa relative résistance.

Quoique la maladie puisse atteindre plus ou moins intensément tous les cépages, toujours lorsque les conditions sont favorables, la vigueur des ceps paraît être un facteur prédisposant. Tout ce qui contribue à l'accroître favorise le développement de la pourriture grise, principalement les porte-greffes vigoureux, surtout ceux qui retardent la maturité, l'irrigation et la fertilisation. A ce sujet, il est particulièrement intéressant de considérer l'influence de la fertilisation azotée qui provoque une plus grande vigueur des ceps et la formation de grappes à grains serrés, aux défenses constitutionnelles normales, à maturation retardée plus sensibles aux attaques.

D'autres facteurs paraissent influer sur la réceptivité des ceps. Parmi les produits utilisés pour lutter contre le mildiou les dérivés cupriques confèrent aux raisins une propriété de résistance à la pourriture grise alors que les fongicides organiques actuellement utilisés influant sur la physiologie de la plante, créent des conditions favorables à la maladie. Les résultats ne peuvent être généralisés et il faut atteindre de nouvelles confirmations mais il ne faut pas oublier que les produits cupriques utilisés après la floraison paraissent durcir la pellicule des baies et la rendre aussi plus résistante à la formation de lésions.

Enfin, le facteur favorisant la pourriture grise le plus important est la présence de blessures de la grappe dues à d'autres attaques cryptogamiques, au ver de la grappe, aux oiseaux, à la grêle, au vent, aux brûlures produites par l'application de bouillies mal préparées ou à l'écoulement des baies par excès d'humidité qui conduisent à un écoulement du jus sucré.

Les déchets végétaux morts provenant ou non du vignoble sont des foyers de développement et d'infection.

En conséquence les mesures préventives à conseiller sont :

— ne pas cultiver de variétés portant des grappes à grains serrés, ni de porte-greffe qui les favorisent;

— limiter la culture de variétés à port retombant et à cycle végétatif long dans des conditions climatiques à automne pluvieux et la culture du porte-greffe retardant la maturation;

— ne pas employer de porte-greffe excessivement vigoureux;

— faire des plantations espacées et employer une taille conduisant à une bonne aération des grappes;

— réduire les arrosages, en quantité et en durée et les supprimer après la véraison;

— limiter strictement l'emploi des engrais azotés aux besoins de la plante;

— intensifier les engrais potassiques;

— effeuiller la partie basse des rameaux après la véraison;

— lutter efficacement contre toute maladie ou parasite particulièrement contre la chenille de la deuxième génération des lépidoptères;

— éviter guêpes et oiseaux;

— effectuer des traitements anticryptogamiques contre le mildiou avec des produits cupriques bien dosés et bien appliqués;

— cueillir et détruire les raisins atteints par la maladie avant les vendanges, le plus tôt possible;

— brûler tous les débris végétaux ou déchets de taille.

Fongicides employés contre la pourriture grise

Parmi les plus remarquables produits préventifs de contact se trouve la famille des phtalimides — captane, folpel et captafol — le dichlofluanide, le thirame, le méthylthirame, la mancozèbe, le probinèbe et la promidione de la famille des hydantoïnes.

Le premier botryticide employé avec succès a été le captane commercialisé sous le nom d'orthozide. On l'emploie à la dose de 0,15 p. 100 de matière active. Il est pratiquement sans danger pour les animaux à sang chaud sinon une légère irritation de la peau en cas de contact prolongé. La DL50 est de 9 000 à 15 000 mg / kg de poids vif pour la souris blanche avec un résidu tolérable de 100 p.p.m. et un délai de sécurité de 7 jours. Il est efficace contre le mildiou et exerce une action stimulante sur la croissance de la vigne.

Le meilleur de tous les botryticides cités ci-dessus est le dichlofluanide commercialisé sous le nom d'Euparène, employé à la dose de 0,10 à 0,15 p. 100 de matière active. C'est un produit peu toxique de DL50 = 1 000 mg /kg de poids vif pour souris, cobaye, lapin et chat (en émulsions aqueuse) avec un résidu tolérable de 1 p.p.m. dans les raisins et un délai de sécurité de 7 à 21 jours. Son action contre la forme larvée de *Botrytis cinerea*, non égalée par les autres fongicides, est radicale.

Il est également efficace contre le mildiou, l'oïdium, les acariens et dans le cas d'infections peu importantes sur des variétés peu sensibles, il peut remplacer les traitements spécifiques.

La promidione, apparue récemment sur le marché sous le nom de Rovral agit en inhibant la germination des spores de botrytis, ou en empêchant le développement du mycelium. Ce fongicide de contact n'est pratiquement pas absorbé par les feuilles incorporé au sol et absorbé par les racines il est rapidement métabolisé. Il contient 50 p. 100 de matière active. Il est peu toxique, de DL50 = 3 500 mg /kg pour la souris. On l'emploie à raison de 750 g /ha en arrêtant son application 15 jours avant les vendanges.

Par ordre d'efficacité, après l'Euparène et le Rovral, se placent les phtalimides puis en troisième position les autres produits cités : Folpel (Orthophaltan et Vini-

coll) DL50 = 10 000, Captane (Orthozide) DL50 = 9 000 à 15 000, Captafol DC50 = 6 200, thirame (Thirasan) DL50 = 750, méthylthirame (Basfungin) DL50 = 1 540, Mancozèbe (Dithane-Ultra) DL50 = 5 000, Probinèbe (Antracol) DL50 = 8 500.

Parmi les produits préventifs systémiques les plus remarquables citons la famille des Benzimidazoles agissant sur *Botrytis cinerea* en inhibant la synthèse de l'ADN : thiobendazol benomyl, thiophénate d'éthyle ou de méthyle, et leurs produits de dégradation, les benzimidazole carbamate d'éthyle (BCE) ou de méthyle (BCM).

Le thiobendazol, le plus anciennement employé est commercialisé sous les noms de Mertect et Tecto. Le benomyl, commercialisé sous le nom de Benlate, plus efficace, se présente sous forme de poudre mouillable à 50 p. 100 de matière active. Il est instable en milieu aqueux et par hydrolyse se transforme en BCM ayant les mêmes propriétés fongicides. La DL50 pour la souris est de 9 590 mg /kg de poids vif. La dose d'emploi est de 1 à 1,2 kg pour 2 000 l de bouillie par ha.

Le thiophénate d'éthyle est commercialisé sous le nom de Cercobin, Enovit, NF35, Pelt sol et Topsin, sous forme de poudre mouillable à 50 p. 100 de matière active. Le thiophénate de méthyle, connu sous le nom de Cercobin M, Enovit M, NF44, Pelt 44 et Topsin M est sous forme de poudre mouillable à 70 p. 100 de matière active En milieu aqueux, ces deux fongicides se décomposent en un certain nombre de métabolites dont les plus importants sont BCE et BCM. Leur DL50 est de 15 000 mg /kg de poids vif pour la souris. La dose d'emploi est de 1,6 à 2 kg pour 2 000 l de bouillie par ha.

Le BCM a été synthétisé directement et commercialisé sous les noms de Bavistin et Derosal, sous forme de poudre mouillable à 50-60 p. 100 de matière active. La DL50 est de 15 000 mg /kg de poids vif pour la souris. La dose moyenne d'emploi est de 1-1,4 kg pour 2 000 l de bouillie par ha.

Les fongicides systémiques du groupe des benzimidazoles sont également actifs contre l'oïdium, le black rot, les acariens et sont peu toxiques pour l'homme et les animaux à sang chaud. On les place dans la classe 5 de toxicité, la moindre, et la tolérance sur les raisins est de 3 p.p.m. de BCM. A l'exception du thiobendazole on n'a pas constaté de différence significative entre les benzimidazoles. Leur action, quand il n'y a pas de souche résistante de *Botrytis cinerea* est supérieure ou au moins égale à celle du dichlofluamide et du folpel. Malheureusement l'emploi répété de ces fongicides systémiques a montré une diminution de leur efficacité ces dernières années, phénomène qui s'explique par une sélection naturelle et le développement de souches de *Botrytis cinerea* résistantes au benzimidazoles.

La sensibilité du champignon étant sous la dépendance d'un gène bien précis, il suffit d'une mutation au niveau de ce gène pour qu'apparaisse une souche résistante ce qui se produit dans la nature étant donné l'énorme capacité de reproduction du champignon. Sur une seule grappe de raisin on a trouvé plus d'un million de spores de *Botrytis cinerea* et dans 1 m³ d'air au voisinage du cep au moment des vendanges, plus de 12 000 conidies. Dans ces conditions, il ne faut pas s'étonner de la période limitée d'efficacité, réduite à quelques années, de chaque produit nouveau. Avec les produits de contact, non systémiques, il ne se forme pratiquement pas de souches résistantes, parce que leur action se limite à une inhibition de la croissance.

Parmi les *produits curatifs* rappelons la dichlozoline plus connue sous le nom de Sclex d'efficacité importante, très supérieure à celle des autres fongicides essayés, mais qui dut être retirée du commerce par ses propres fabricants à cause de ses

effets dangereux et de sa toxicité résiduelle. Récemment est apparu sur le marché le Ronilan dont la matière active est la vindozoline. Il paraît donner de bons résultats à la dose de 500 g de matière active /ha, mais nous manquons de recul pour le juger.

Programmes de traitements

L'application des traitements de contacts spécifiques contre la pourriture grise doit être faite très tôt avec un matériel permettant une grande pénétration, de façon répétée, à des doses relativement élevées, et spécialement sur les grappes des deux côtés du rang de vigne.

Le programme standard d'application consiste en 4 traitements :

— 1er traitement : fin de floraison, début de nouaison;
— 2e traitement : avant la fermeture des grappes, environ 1 mois, plus tard;
— 3e traitement : au début de la véraison;
— 4e traitement : 3 ou 4 semaines avant les vendanges.

Le premier traitement est réalisé en période critique car les débris des pièces florales peuvent constituer une base nutritive favorable à l'installation saprophytique de *Botrytis cinerea*. Le 2e traitement est réalisé avant que le grossissement des baies les presse les unes contre les autres, empêchant la pénétration du fongicide à l'intérieur de la grappe. Le 3e traitement coïncide avec un état de grande sensibilité des baies à la pourriture grise. Le 4e traitement a pour but de renouveler la protection de la grappe avant la période d'évolution du parasite la plus dangereuse, au moment de la pleine maturité du raisin déterminant la période des vendanges. Il est responsable de ce qu'un certain nombre de produits actifs peuvent se trouver à l'état de résidus toxiques, inhibant ou gênant la fermentation.

Il faut aussi noter le programme d'application dit 15-15 basé sur les conditions ambiantes de développement étudiées dans le 2e chapitre de cet exposé. Les traitements sont appliqués quand un appareil de mesure nommé thermohygrographe, installé dans le vignoble, enregistre une période de 15 h pendant laquelle la vigne est mouillée à la température moyenne de 15 à 20 °C. L'application de ce programme est moins efficace que celle du programme standard parce que les traitements ne se font que lorsque les conditions de développement sont déjà établies alors que les produits utilisés sont d'action essentiellement préventive.

Dans le cas d'application de produits systémiques la pénétration peut se faire au niveau des racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits jeunes. Quel que soit l'endroit d'application et de pénétration, ils migrent au niveau des parois cellulaires jusqu'au xylème où ils sont incorporés au courant de sève brute se dirigeant vers les zones de forte transpiration dans toute la plante à l'exception de l'épiderme des fruits. Par conséquent, la protection se limite aux feuilles, où l'on retourne le fongicide systémique surtout dans les parties apicales et marginales du limbe, ainsi qu'aux parties vertes des rameaux, aux inflorescences, rafles et pédoncules des grappes.

La protection des baies par les produits systémiques se limite à l'action de contact, donc préventive et il faut appliquer les règles de traitements déjà établies ci-dessus.

L'expérience a montré qu'il faut commencer la lutte tout de suite après la

floraison, en répétant les traitements une ou deux fois jusqu'à la véraison, selon les conditions météorologiques. Les traitements les plus tardifs n'améliorent pas beaucoup la protection des grappes mais augmentent sensiblement les résidus de fongicides dans la vendange.

Enfin les programmes d'application polyvalents sont employés dans la lutte simultanée contre le mildiou et la pourriture grise, en associant les produits actifs contre les deux parasites. La non coïncidence du nombre et des dates de traitements nécessaires et les méthodes d'application différentes font que ces programmes sont peu efficaces et peu employés.

Effets de la pourriture grise des raisins sur les caractères des vins

Outre la réduction ou la destruction de la récolte due à la pourriture grise, souvent totalement imprévisibles à l'approche des vendanges, quand le raisin est mûr, il faut ajouter les dégâts indirects au moment de la vinification quand les raisins sont fortement attaqués. On a pu établir un rapport analytique et sensoriel entre la qualité du vin et la gravité de l'attaque par *Botrytis cinerea*. Particulièrement dans les vins rouges dont la qualité baisse. *Botrytis cinerea* se développe sur le raisin en augmentant la combustion respiratoire des sucres et des acides organiques consommant plus d'acide tartrique que d'acide malique contrairement à ce qui se passe dans le processus normal de maturation. De même les tanins et les matières azotées solubles diminuent d'une façon importante. A partir du glycérol, manitol et éthanol et des acides citrique, acétique et gluconique, il forme un mucilage soluble de dextrane et une cellulo-dextrane qui donnent une masse visqueuse restant longtemps en suspension dans le vin. En comparant le degré de pourriture du raisin et la variation de composition du vin, on a prouvé qu'il n'existe pas une relation étroite entre les teneurs en méthanol, alcools supérieurs, esters et l'intensité de la pourriture, quoiqu'il y ait une tendance générale à la diminution de ces composés quand l'attaque est intense, et une augmentation systématique et parfois importante des polyols toujours moins accusée pour les variétés blanches à mesure que la pourriture croît. Font exception le propanol-1 parmi les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle parmi les esters.

La diminution du caprylate d'éthyle, élément important de la qualité du vin, et l'augmentation des polyols pendant la fermentation alcoolique d'autant plus importante que la pourriture est plus forte, sont très significatives.

Le mycelium du botrytis sécrète différentes enzymes qui se répandent dans la pulpe du raisin et dans le moût, enzymes pectolytiques et cellulytiques, protéases et oxydases principalement la cytase qui lui permet de dissocier la membrane de la pellicule de la baie et la laccase, polyphénoloxydase soluble d'une grande importance qui passe intégralement dans le moût ainsi que le complexe antibiotique appelé *botryticine* encore peu connu.

Il se produit également de notables quantités d'acide mucique ou galactarique, conséquence d'un important changement métabolique de l'hôte provoqué par la pourriture : une oxydation enzymatique de l'acide galacturonique en acide mucique, l'acide galacturonique étant produit, après l'infection à partir des pectines du raisin par les enzymes pectolytiques. Sa combinaison dans le vin avec les cations Ca donnant le mucate de calcium qui précipite quand sa concentration est suffisante.

En conséquence les moûts provenant de raisins très attaqués par la pourriture grise donnent des moûts profondément déséquilibrés, peu acides avec des goûts bizarres fermentant lentement et irrégulièrement à cause de la présence de *botryticine* et de la pauvreté en matières azotées.

Il faut aussi remarquer que dans tout moût provenant de raisins mûrs coexistent des substances indispensables à la multiplication des levures et des substances peu connues qui freinent leur croissance jusqu'à l'inhiber complètement. Le raisin pourri en contient beaucoup avec une prépondérance des secondes substances rendant la fermentation difficile. Les vins obtenus à partir de raisins pourris sont facilement oxydables car la laccase a une activité plus grande que la tyrosinase, composant naturel du raisin. D'activité identique vis-à-vis du méthyl-4 pyrocatéchol, la laccase est 30 fois plus active que la tyrosinase vis-à-vis des composés phénoliques (anthocyanes et tanin). La plus grande gravité des phénomènes oxydatifs dans les vendanges pourries par comparaison aux vendanges saines, est donc essentiellement liée à la nature différente des enzymes, tout en n'étant pas forcément en rapport avec leur concentration.

La tyrosinase naturelle des raisins sains présente une bonne activité entre pH 3 et pH 5, mais elle n'est stable qu'aux environs de pH 7. Elle perd donc rapidement son activité dans le vin. Au contraire la laccase sécrétée par *Botrytis cinerea* qui présente aussi une activité maximale entre pH 3 et pH 5 est particulièrement stable en milieu acide ce qui la rend dangereuse dans le moût et le vin.

Autre problème actuel dans certains vins provenant de raisins pourris, la quantité anormale de SO_2 combiné nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de SO_2 libre sans dépasser les limites permises par la loi. On a dosé les acides pyruvique et α-cétoglutarique, les acides glucuronique et galacturonique, les aldéhydes glycolique et glycérique, divers alcools supérieurs et l'acétone formés par *Botrytis*, par des bactéries accompagnantes ou pendant la fermentation. Il ne faut pas oublier l'importance pendant la vinification des résidus de fongicides. Les résidus persistant sur les raisins au moment de la récolte dépendent du temps écoulé entre le dernier traitement et les vendanges, des conditions climatiques pendant ce laps de temps, de la texture de la pellicule des baies, des quantités, tension superficielle et viscosité des produits employés.

On a établi une corrélation linéaire entre le poids des baies et la quantité de produit retenu.

On est arrivé à la conclusion qu'il doit s'écouler 3 semaines à un mois entre le dernier traitement et la date des vendanges. Le programme standard que nous avons établi est conforme à cette exigence.

Il n'existe pas de relation définie entre la quantité de pesticide sur les raisins et dans le moût. Pour une même quantité de pesticide sur les raisins, les moûts rouges en contiennent davantage que les moûts blancs à cause de la macération des marcs et du type de pressoir utilisé. La masse compacte de marc d'un pressoir traditionnel retient une plus grande quantité de pesticide que si l'on procède à plusieurs émiettements de la masse avec pressage de celle-ci en couche mince.

Parmi les pesticides de contact que nous avons mentionnés le dichlofluanide et toutes les phtalimides : captane, folpel et captafol ont une action retardatrice de la fermentation. Le thirame, le méthyl-thirame, mancozèbe et probinèbe ont une action réduite ou sont sans action. Parmi les pesticides systémiques de la famille des benzimidazoles, aucun n'a d'effet sur la vinification; les moûts fermentent normalement sans altération du goût bien que des résidus de BCM stables passent dans le vin. Les traitements à la bentonite, de grand pouvoir absorbant, permettent de les éliminer notablement.

Enrichissement du sol en pesticides et effets qui en résultent

La quantité et les effets du pesticide accumulé dans le sol dépendent du type de pesticide employé, du nombre de traitements, de la quantité de matière active par unité de surface. Parmi les produits de contact autorisés employés aux doses usuelles, aucun ne présente une action néfaste sur la microflore et la microfaune du sol ni une toxicité directe lors d'ingestion par l'homme ou les animaux des plantes cultivées, leur matière active étant rapidement dégradée dans les sols riches en matière organique et un peu moins dans les sols sablonneux.

Au contraire, parmi les produits systémiques, les benzimidazoles perturbent l'équilibre microbien et la faune du sol et les organes des plantes à la surface. Le BCM est très stable et on ne connaît que quelques rares microorganismes capables de le dégrader en métabolites non fongicides. Il faut compter environ 3 mois pour arriver à une dégradation de 50 p. 100 en terrains viticoles. Il a un grand pouvoir de pénétration dans les sols. La dégradation en surface est faible et presque nulle en profondeur. On a constaté que les benzimidazoles diminuent la nitrification par les bactéries et champignons en agissant comme répulsifs et sont très toxiques pour les vers de terre. Sur les parcelles qui en contiennent, la persistance des feuilles mortes augmente sensiblement.

Les dangers de la lutte chimique sont venus troubler l'équilibre écologique de la nature alors que l'on persiste à chercher une arme sélective contre la pourriture grise. Les effets des résidus doivent nous faire réfléchir, et nous devons nous souvenir de R. Carson et de son livre « Silent spring ».

Summary

Grape rot, control means and influence on the wine characteristics

A general survay emphasizing the high incidence of grape rot due to the increasingly frequent and widely spread occurence of *Botrytis cinerea* is presented and followed by a discussion of the etiology and development of this fungus with emphasis on factors favourising its multiplication.

The means of prevention, the efficient fungicides and the most recommended treatments are reviewed.

Finally, the influence of grape rot on the characteristics of wines as well as on the activities in the must during fermentation, the residual levels of the botricides used and the accumulation of these residues in the soil are considered.

Key-words: *Grapes — Rot — Etiology — Development — Quantitative incidences — Control means.*

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 137-139.

INTERVENTION

Modification du raisin parasité par *Botrytis cinerea* et par différents microorganismes

J. C. SAPIS

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
Institut National de la Recherche Agronomique (France)

La flore microbienne des raisins pourris reste encore mal connue; à côté de *Botrytis cinerea* on constate la présence très fréquente de champignons divers ainsi que de bactéries.

Il est certain que tous ces microorganismes apportent des modifications aux raisins ainsi parasités, modifications susceptibles d'avoir une incidence sur la constitution et la composition des vins qui en sont issus.

Dans le cadre général de l'étude de la qualité et de la stabilité des vins, nous présentons quelques résultats récents concernant les modifications apportées au jus de raisin par divers microorganismes identifiés sur les raisins pourris.

Les essais ont été réalisés au laboratoire, dans des conditions de cultures pures sur jus de raisin sain stérile.

Trois aspects ont été abordés :

— Influence de *Botrytis cinerea* et des bactéries acétiques sur la combinaison de l'anhydride sulfureux.

— Influence de *Botrytis cinerea* et de divers microorganismes sur la présence de laccase.

— Influence de *Botrytis cinerea* et de divers microorganismes sur les teneurs en polyols.

Les microorganismes utilisés ont été les suivants :

— *Botrytis cinerea* = 1 souche.
— Bactéries acétiques = 2 souches.
— *Penicillium* = 7 souches.
— *Aspergillus* = 7 souches.
— *Fusarium* = 2 souches.
— *Cladosporium, Alternaria, Rhizopus, Aureobasidium* = 1 souche de chaque microorganisme.

A l'exception des bactéries acétiques, ceux-ci proviennent de la mycothèque du *Central Bureau voor Schimmel-cultures*, Baarn (Hollande).

Les cultures, d'une durée générale de 6 semaines, sont réalisées à la température du laboratoire.

Les déterminations analytiques sont les suivantes :

— Détermination du pouvoir de combinaison de l'anhydride sulfureux.
— Mesure de l'activité laccase par méthode polarographique.
— Dosage des polyols par chromatographie en phase gazeuse.

Influence de *Botrytis cinerea* et des bactéries acétiques sur la combinaison de l'anhydride sulfureux

Le développement de la souche étudiée de *Botrytis cinerea*, seul, a peu d'influence sur le pouvoir de combinaison des jus parasités.

Par contre, le développement de la souche d'*Acetomonas oxydans*, bactérie acétique identifiée sur le raisin, entraîne une augmentation importante du pouvoir de combinaison des jus; ce résultat confirme le rôle important joué par ces bactéries dans les combinaisons anormales de l'anhydride sulfureux; l'analyse d'un tel jus par fractionnement des corps cétoniques qu'il contient sur résine échangeuse d'anions fait apparaître la présence systématique, parfois à des concentrations importantes, d'une substance neutre à fonctions carbonyles, précédemment identifiée dans les jus de raisin pourri au céto-5 fructose.

Outre les cultures pures de chaque microorganisme, nous avons réalisé des cultures mixtes; parmi celles-ci, celles de *Botrytis cinerea* et d'*Acetomonas oxydans* ont fourni un résultat intéressant : le pouvoir de combinaison du jus ainsi parasité est supérieur à celui du jus parasité par la seule souche d'*Acetomonas*; si l'on admet que l'influence de *Botrytis* est faible, ceci laisse supposer que le champignon favorise le développement des bactéries; ce résultat est à rapporter du fait que certains auteurs ont trouvé que le nombre d'*Acetomonas*, sur les raisins pourris, est supérieur à celui sur raisins sains, probablement à la suite de l'éclatement des baies de raisins et du développement, à l'air libre et sur le jus sucré, des bactéries.

Influence de *Botrytis cinerea* et de divers microorganismes sur la présence de laccase

Dubernet a montré la formation importante de laccase par des souches de *Botrytis* isolées de vendange pourrie; d'après Kovacs, cette formation ne serait pas systématique; elle dépendrait de la nature de la souche ainsi que de la présence éventuelle de *Penicillium*, induisant dans de nombreux cas la synthèse de la laccase par *Botrytis*. Nos premiers résultats confirment que, en culture pure sur jus de raisin comme sur broyat de raisin blanc ou rouge, la souche étudiée ici n'est capable de produire de la laccase qu'en très faible quantité. En outre, tous les autres microorganismes testés n'en forment pas.

Influence de *Botrytis cinerea* et de divers microorganismes sur la teneur en polyols

Certains travaux réalisés à l'Institut d'Œnologie ont montré que les jus de raisins pourris ont des teneurs importantes en polyols, très supérieures à celles des jus de raisins sains; c'est le cas, en particulier, du glycérol, du mannitol et de l'arabitol.

Les résultats obtenus sur cultures pures, au cours de cet essai, font apparaître des variations importantes selon les microorganismes; si les jus parasités par *Botrytis cinerea* et par certains *Penicillium* et *Aspergillus* contiennent environ dix fois plus de glycérol que le jus témoin, dans d'autres cas les formations sont moyennes, faibles ou nulles; il en est de même pour l'arabitol et le mannitol ainsi que, dans une moindre mesure, pour le sorbitol.

Cette étude sera poursuivie ultérieurement dans le sens d'un approfondissement des modifications apportées au raisin par la microflore des raisins pourris et à leurs conséquences sur la qualité des vins élaborés à partir de ces raisins.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 141-145.

INTERVENTION

Relation entre les substances terpéniques et la qualité du raisin (Rôle du *Botrytis cinerea*)

J. N. BOIDRON

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II (France),

Grâce aux travaux de CORDONNIER, WEBB, DRAWERT, TERRIER et BOIDRON, nous savons que les substances terpéniques sont le support essentiel de l'arôme de certains cépages : les Muscats et à un moindre degré les autres variétés aromatiques; Riesling, Gewurtztraminer, Müller-Thurgau, Sylvaner, etc.

Nous avons mis au point d'abord avec TERRIER, puis avec DIAZ CERVANTES des méthodes permettant de doser l'ensemble de ces substances en 2 heures. La sensibilité de ces dosages permet d'atteindre le microgramme par litre.

L'utilisation de ces méthodes permet de nombreuses études sur le plan aromatique par exemple la sélection clônale ou le rôle du *Botrytis cinerea*. C'est ce dernier point qui retiendra notre attention aujourd'hui.

L'étude des arômes de raisin est toujours faite sur des baies saines. Cependant il est de la plus grande importance de connaître le rôle de *Botrytis cinerea* sur les arômes. La qualité organoleptique des raisins rouges et des raisins aromatiques est particulièrement sensible aux attaques de ce champignon. La couleur est détruite, les arômes disparaissent et des odeurs phénoliques et iodées se développent. Les Muscats perdent rapidement leur arôme spécifique. Des études sont faites actuellement pour préciser d'une part le rôle du *Botrytis cinerea* sur un milieu de composition connue et d'autre part sur la composition des raisins *in situ*.

Les essais en laboratoire sont effectués sur du moût d'Ugni Blanc additionné de quantités connues des différents terpènes et contenant en outre une faible quantité de phényl-2 éthanol naturel.

Le milieu stérile est ensemencé par une souche de *Botrytis cinerea* répertoriée.

Des prélèvements périodiques de ce jus permettent de suivre l'évolution des composés terpéniques et du phényl-2 éthanol au cours du développement du champignon (fig. 1 et 2). Les résultats sont remarquables. Tous les dérivés terpéniques, oxydes compris, disparaissent en 20 jours. Il en est de même pour le phényl-

2 éthanol. Par ailleurs, dans notre laboratoire, LÉVÊQUE vient de montrer que les traces d'éthanol naturel disparaissent. Les rapports géraniol/nérol et linalol/géraniol augmentent ce qui démontre que le nérol disparaît plus vite que le géraniol et celui-ci plus vite que le linalol, les oxydes et le phényl-2 éthanol disparaissent en dernier. Le *Botrytis cinerea* attaque donc préférentiellement les alcools terpéniques acycliques. Cette remarque est importante sur le plan organoleptique : géraniol, nérol et linalol sont pratiquement les seuls à jouer un rôle aromatique, leur disparition préférentielle rend donc l'attaque de ce champignon particulièrement préjudiciable à la qualité aromatique des moûts. Par ailleurs, le *Botrytis* se

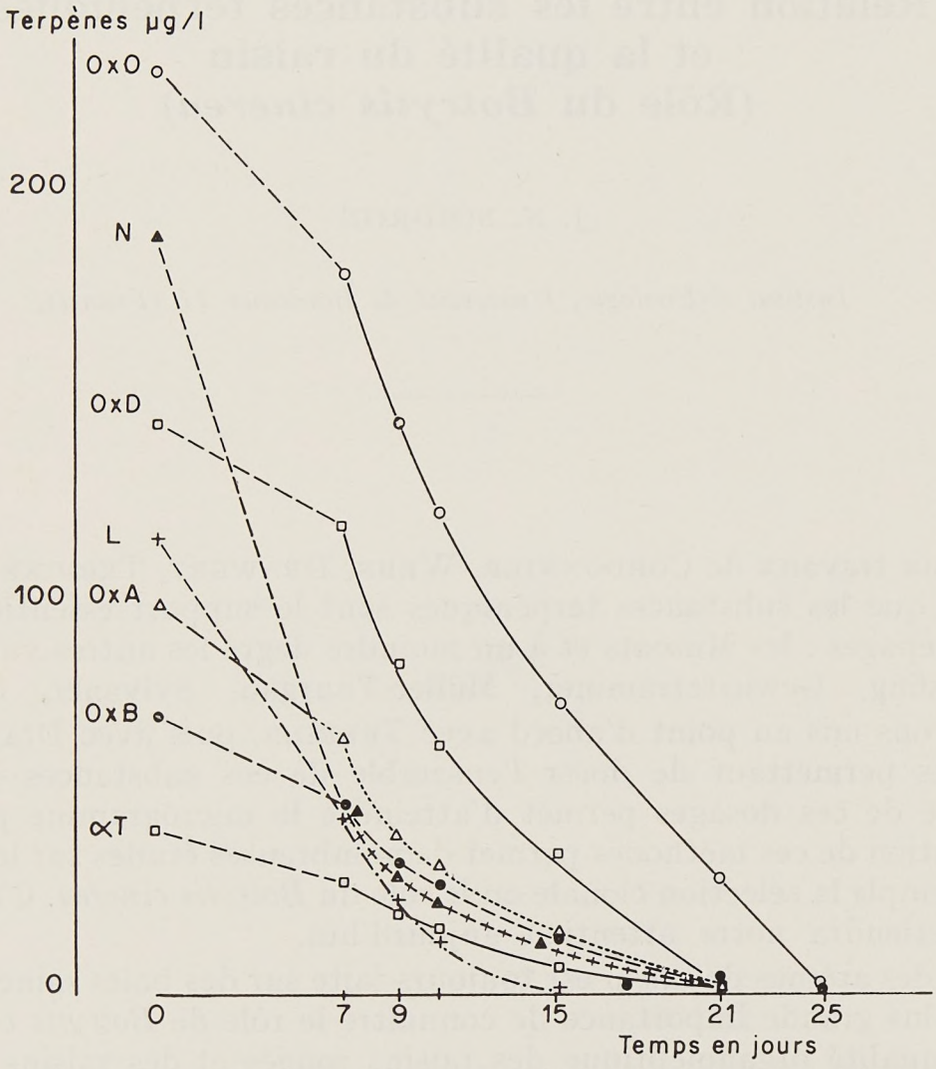


FIG. 1. — *Évolution des substances volatiles en milieu synthétique sur l'influence de* Botrytis cinerea

développe beaucoup moins bien sur le moût non additionné de terpènes, il semble donc que les alcools terpéniques acycliques favorisent cette croissance.

Dans d'autres essais une étude plus détaillée durant les premiers jours montrent qu'il y a d'abord une légère croissance des oxydes A, C et D du linalol, de l'α-terpinéol et du phényl-2 éthanol avant leur dégradation. Deux hypothèses sont possibles pour rendre compte de ces résultats.

a) Le *Botrytis cinerea* provoque une interconversion des substances terpéniques. Les terpènes acycliques sont d'abord transformés en oxydes et α-terpinéol puis ceux-ci sont dégradés.

b) Une oxydation chimique intervient parallèlement à l'attaque du *Botrytis cinerea*.

La deuxième hypothèse nous paraît la plus vraisemblable.

Sur la vigne le processus de dégradation est souvent limité à la phase initiale. De plus d'autres phénomènes secondaires viennent se superposer. Néanmoins les résultats obtenus en laboratoire sont confirmés sur les raisins sains et pourris prélevés sur une même vigne.

Cette étude sur vigne a été renouvelée plusieurs fois en 1974, 1975 et 1976

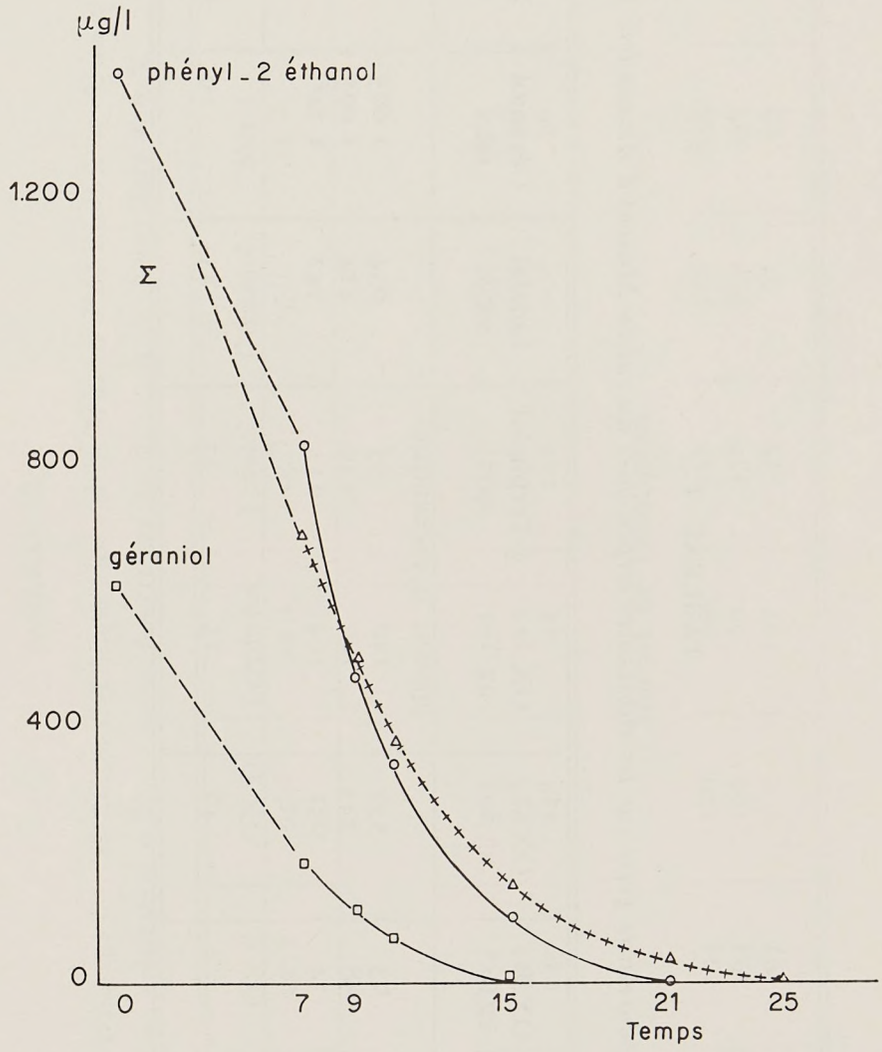


FIG. 2. — *Évolution du géraniol du phényl-2 éthanol et de la somme des terpènes en milieu synthétique sous l'influence de* Botrytis cinerea

sur Muscat de Frontignan et Muscat d'Alexandrie (tabl. 1 et 2). Dans tous les cas on note une chute spectaculaire pouvant dépasser 90 p. 100 entre le lot sain et le lot pourri pour le nérol, le géraniol et le linalol. Les oxydes et l'α-terpinéol sont souvent beaucoup plus importants, parfois ils commencent eux-mêmes à décroître. Le phényl-2 éthanol croît d'un facteur 10 à 30 dans tous les cas.

On note en plus l'apparition d'une note phéniquée et sur les chromatogrammes on voit apparaître des pics attribuables à des substances phénoliques non halogénées en voie d'identification.

TABLEAU I

Rôle de la pourriture grise sur les substances terpéniques du raisin Muscat d'Alexandrie (1974)

Lot	Sucre g/l	OX.A µg/l	OX.B µg/l	OX.C µg/l	OX.D µg/l	α-Terpinéol µg/l	Linalol µg/l	Géraniol µg/l	Nérol µg/l	Σ µg/l	Hotriènnol h/h
O	247	80	63	539	140	95	634	1 065	350	2 966	0,79
P	289	119	58	343	140	130	424	1 005	421	2 640	1,41
TH . . .	289	94	74	631	164	111	742	1 246	409	3 471	0,92
V p. 100		+ 27	— 22	— 46	— 15	+ 17	— 43	— 19	+ 3	— 24	+ 53

TABLEAU 2

Rôle de la pourriture grise sur les substances terpéniques du raisin Muscat d'Alexandrie et Muscat de Frontignan

1 = *pourriture 0 %* 2 = *pourriture 20 %* 3 = *pourriture 100 %*

Lot	OX.A µg/l	OX.B µg/l	OX.C µg/l	OX.D µg/l	Terpinéol µg/l	Linalol µg/l	Géraniol µg/l	Nérol µg/l	Σ µg/l	Hotriénol h/h	Phényl-2 éthanol µg/l
Muscat d'Alexandrie											
1.	67	67	634	163	91	947	2 552	272	4 793	0,97	139
2.	100	48	363	158	45	556	1 304	124	2 698	1,09	1 273
3.	109	62	149	248	44	142	296	39	1 089	1,38	3 900
Muscat de Frontignan											
1.	50	49	434	129	89	510	776	855	2 892	0,25	139
2.	167	79	364	196	60	338	593	350	2 147	0,95	1 159
3.	133	62	97	167	107	49	51	15	671	0,51	1 833

Techniques de vinification et de conservation des vins de qualité

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 149-159.

Les oxydases des raisins et des vins

A. M. MAYER

Département de Botanique,
Université Habraïque de Jérusalem (Israel)

Résumé

La catéchol-oxydase qui est présente dans les raisins et pendant la vinification est décrite; ses propriétés sont résumées. L'importance de la catéchol-oxydase dans l'appréciation de la qualité des vins est mise en évidence; on en conclut que l'activité initiale dans les moûts est souhaitable mais sa présence ultérieure dans le vin est nuisible. La teneur en catéchol-oxydase peut être utilisée comme indicateur de la qualité des vendanges. Les propriétés de la laccase provenant de *Botrytis Cinerea* sont également résumées et comparées à celles de la catéchol-oxydase. Les raisons de l'existence de cette enzyme dans les vins sont discutées. La présence est probablement toujours nuisible à la qualité des vins.

Mots clés : *Raisins — Vinification — Catécholoxydase-laccase* (*Botrytis cinerea*) — *Propriétés — Rôle.*

Introduction

Aujourd'hui, les enzymes qui utilisent l'oxygène afin d'oxyder certains composés sont désignées par le terme d'oxydases. Dans cette discussion, nous définissons une enzyme comme une molécule protéique qui agit en catalysant une réaction se déroulant normalement dans la cellule vivante. Les enzymes peuvent agir cependant en dehors des cellules vivantes : elles sont quelquefois excrétées par les cellules et elles peuvent être facilement extraites des cellules. De telles enzymes extraites, agissent *in vitro*, comme catalyseurs et deviennent de plus en plus importantes dans l'industrie alimentaire. La réaction catalysée par les oxydases peut s'écrire de la manière suivante :

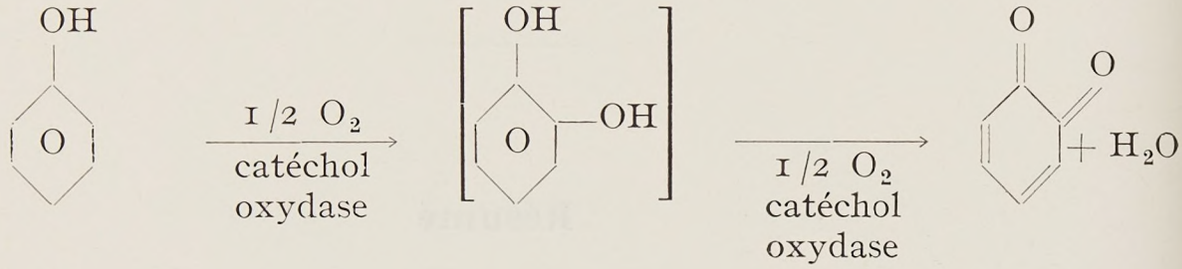
1) $2\ RH_2 + O_2 \rightarrow {}_2R + {}_2H_2O$

2) $2\ RH + O_2 \rightarrow 2\ RHO$

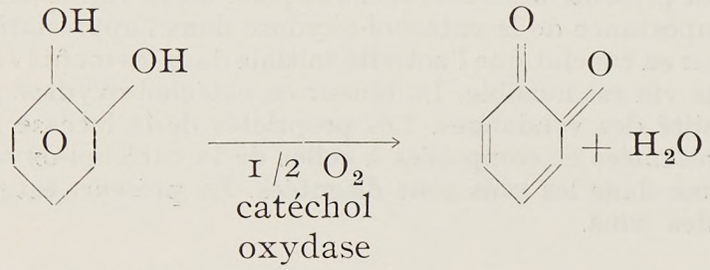
Dans la réaction (1) l'oxygène exerce la fonction d'accepteur de l'hydrogène provenant du composé qui est lui-même oxydé; dans la réaction (2) l'oxygène est directement incorporé dans le composé qui est oxydé.

Les oxydases qui catalysent les réactions (1) et (2) sont très nombreuses et comprennent des enzymes telles que la cytochrome-oxydase (enzyme essentielle pour la respiration des plantes) les acides aminés-oxydases, l'acide-ascorbique-oxydase, la lipoxygénase, la catéchol-oxygénase, la catéchol-oxydase, la laccase et d'autres enzymes encore. Nous limiterons notre discussion aux oxydases qui oxydent les composés phénoliques, soit par la réaction (1), soit par la réaction (2), c'est-à-dire les catéchol-oxydases et les laccases. Mais ces deux enzymes font partie d'une famille d'enzymes qui ont des propriétés voisines mais pas identiques. La catéchol-oxydase et la laccase sont toutes deux des protéines contenant du cuivre qui joue un rôle essentiel dans leur activité.

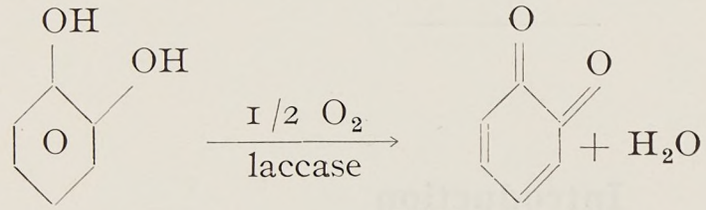
La réaction catalysée par la catéchol-oxydase est :

(3) 

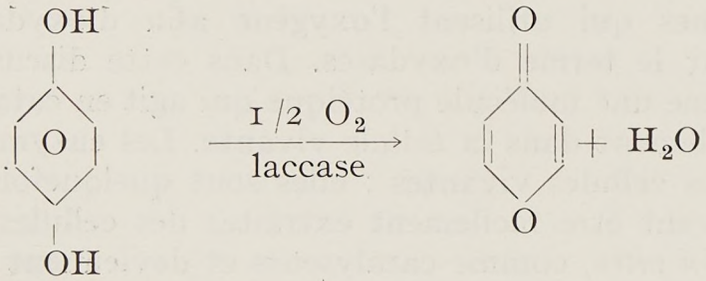
et

(4) 

Les laccases catalysent la réaction :

(5*a*) 

ou

(5*b*) 

Ces deux enzymes sont largement répandues chez les bactéries, les plantes et les champignons. Un des aspects les plus importants de la réaction catalysée par ces enzymes est que les produits de la réaction, les quinones, sont des composés colorés et très réactifs. Compte tenu de ces propriétés, il est souvent très important,

en chimie alimentaire en particulier, de pouvoir éviter ou contrôler les activités de ces enzymes.

Les catéchol-oxydases d'origine végétale peuvent être localisées dans des parties différentes de la cellule. Elles sont soit solubles, soit associées à des organites tels que les mitochondries, dans lesquelles la respiration se produit ou les chloroplastes, sites de la photosynthèse :

Un fait caractéristique des catéchol-oxydases est leur activité relativement faible; dans les cellules intactes tout au moins il n'y a pas d'accumulation de produits. Par contre, aussitôt que les cellules des plantes sont abîmées, meurtries ou atteintes de maladies, la réaction catalysée par les enzymes devient plus importante. Il y a probablement plusieurs causes à cette augmentation de la réactivité :

1) l'oxygène est plus disponible;
2) l'enzyme et le substrat, qui sont normalement séparés arrivent en contact;
3) l'enzyme est partiellement activée.

On a moins d'indications sur la localisation des laccases dans les cellules des plantes et des champignons. Elles sont probablement en solution mais ce fait reste à vérifier.

Plusieurs auteurs ont étudié les catéchol-oxydases dans les raisins et les vins (Gouirand, 1895; Laborde, 1896, Poux, 1966; Monte Doro, 1969; Ivanov et Ivanova, 1968; Morcovich et Rikhter, 1965; Demeaux et Bidan, 1967; Radler et Torokfalvy, 1973).

Cependant, la plupart de ces travaux n'a pas fait une étude suffisamment détaillée de la nature des catéchol-oxydases des raisins.

Par contre, plus récemment une série d'analyses beaucoup plus détaillées des catéchol-oxydases a été effectuée. Dubernet et Ribéreau-Gayon (1973, 1974) ont décrit quelques-unes des propriétés de cette enzyme et ont également suivi son développement au cours de la maturation des raisins. Traverso-Rueda et Singleton (1973) ont suivi l'activité de la catéchol-oxydase au cours de la préparation du jus de raisin et ont considéré quelques-unes des conséquences de sa présence. Probablement l'analyse la plus détaillée sur la nature et les fonctions de la catéchol-oxydase dans les raisins et les vins provient du travail effectué dans notre laboratoire (Lerner *et al.*, 1971-1972-1974; Harel *et al.*, 1973; Harel et Mayer, 1971; Lerner et Mayer, 1975, 1976; Kidron, 1976).

Bien qu'il existe des informations générales sur les laccases, on les a beaucoup étudiées dans les raisins et les vins (Levine, 1966). Bien que Laborde (1896, 1897) et Bertrand (1896) aient suggéré la possibilité de sécrétion par les champignons d'une oxydase dans les raisins, le mérite revient à Dubernet et Ribéreau-Gayon (1973, 1975) d'avoir mis en évidence l'importance possible de cette enzyme dans la vinification. La laccase provenant de *Botrytis cinerea*, qui attaque les raisins, a été étudiée plus attentivement (Dubernet *et al.*, 1977) et ses propriétés font l'objet de recherches dans notre laboratoire.

Variation de l'activité de la catechol-oxydase au cours de la maturation et de la vinification

L'activité de la catéchol-oxydase est importante dans les raisins verts et elle diminue d'une façon constante au cours de la maturation (Kidron, 1976). A ce moment de la vendange, qui arrive au milieu d'août, l'activité n'est que 5 p. 100

de la valeur maximum. Pendant cette période, la teneur en sucre des raisins a augmenté d'environ 2° Brix à environ 15-20° Brix. Aussi, au cours de la période de maturation rapide des raisins, alors que la teneur en sucre, le poids sec et le poids frais augmentent, l'apparition de l'activité de la catéchol-oxydase s'arrête et la quantité proprement dite dans les tissus, diminue. On trouve dans la littérature des résultats montrant de telles diminutions de l'activité de la catéchol-oxydase en particulier ceux de IVANOV et IVANOVA (1968) et de TRAVERSO-RUEDA et SINGLETON (1973). Ils ont cependant étudié des périodes plus courtes. Une analyse attentive de leurs résultats et des nôtres, indique une augmentation de l'activité tout à fait à la fin de la maturation.

En ce qui concerne la valeur absolue de l'activité, les seuls résultats comparables sont ceux de DUBERNET (1974). Ils sont très semblables aux nôtres, ils montrent une diminution rapide de l'activité de l'enzyme au cours de la maturation. Il faut cependant constater une différence majeure très importante : l'activité absolue du cépage Malbec est environ deux fois plus importante que celle des autres cépages étudiés; par contre, l'activité résiduelle au moment de la vendange est environ 50 p. 100 de la valeur maximum. Cette différence très importante est probablement en rapport étroit avec les conditions de température et d'humidité au cours de la maturation, qui sont très différentes entre Israël et la France.

Afin d'apprécier l'importance possible de la catéchol-oxydase, pendant la vinification, nous avons suivi son activité au cours des opérations qu'elle comporte (KIDRON, 1976). Une activité appréciable est présente dans le moût et demeure même après sulfitage. Dès le départ en fermentation, l'activité commence à diminuer et, en fin de fermentation, il ne reste que 10 p. 100 de l'activité initiale. Les étapes suivantes de la vinification entraînent la disparition totale de l'activité de l'enzyme. On peut estimer que trois causes interviennent dans cette disparition de l'enzyme :

— sa précipitation pendant la fermentation et la décantation;

— une partie de l'activité est inhibée par l'addition de SO_2 mais cette inhibition est reversible;

— l'alcool formé durant la fermentation inhibe également l'activité de l'enzyme.

L'inhibition par SO_2 est rapide; elle est fonction de la quantité de SO_2 ajoutée; elle varie entre 15 et 100 p. 100 au bout de deux heures avec 5 à 40 mg /l de SO_2.

Ainsi, il apparaît que, dans des conditions normales de vinification la catéchol-oxydase disparaît entièrement ou tout au moins son activité est supprimée. DUBERNET (1974) a signalé une faible activité résiduelle de la catéchol-oxydase dans des vins français. Il est possible qu'elle soit due à l'activité initiale plus importante présente dans les raisins au moment de la vendange. Néanmoins, il ne faut pas sous-estimer l'importance de l'activité de l'enzyme au début de la vinification; pour cette raison, il faut décrire les propriétés de l'enzyme.

Propriétés de la catéchol-oxydase du raisin et du moût

Un certain nombre de paramètres simples peut servir à décrire les propriétés d'une enzyme, par exemple le pH auquel se trouve le maximum d'activité, l'affinité pour certains substrats (le Km), la réponse aux inhibiteurs de types différents. Il faut cependant connaître également certaines caractéristiques telles que le poids moléculaire, la nature de l'enzyme et sa composition en acides aminés.

Le tableau 1, montre quelques-unes des propriétés principales de la catéchol-oxydase des raisins; ces propriétés changent relativement peu au cours du travail des raisins et de la fermentation.

Par conséquence, la réponse aux inhibiteurs et le Km qui représente l'affinité pour les substrats changent également relativement peu. Quelques propriétés cependant sont dans une certaine mesure affectées, en particulier le diagramme de séparation par électro-focalisation, le diagramme électrophorétique et la réponse à des variations de pH (pH shock).

TABLEAU I

Propriétés de la catéchol-oxydase du raisin

pH optimum d'activité	5,0 et 7,3
Km méthyl 4 pyro-catéchol	3,3 6,5 mM
p-crésol	0,6 mM
O_2 (méthyl-4-catéchol)	17-19 p. 100
Inhibition p. 100 di éthyl dithiocarbamate 0,025 mM	14
phényl thio urée 0,025 mM	78
phényl hydrazine 0,5 mM	100
Pic d'électrofocalisation	pH 4,0 environ
Nombre de bandes par électrophorèse sur acrylanime (nombre d'iso enzymes)	8
Atomes de Cu /Molécule	au moins 1

(Harel et Mayer 1971, Lerner *et al.* 1972-1974, Harel *et al.* 1973, Kidron 1976).

Modifications sous l'effet d'une variation de pH (pH-shock)

La catéchol-oxydase présente dans les chloroplastes isolés des raisins, de même que l'enzyme extraite de tels organites ont une caractéristique tout à fait particulière. Le tableau 2 montre l'existence de deux activités optima de la catéchol-oxydase des raisins, l'une à pH 5,0 l'autre à pH 7,3. Le rapport entre ces activités est normalement tel que l'activité à pH 5,0 soit trois fois plus importante que celle à pH 7,3. Par contre si l'enzyme, préparée à pH 7,0, est exposée en milieu acide-pH 5,0 — pendant quelques minutes — cette activité diminue de nouveau lentement en fonction du temps (fig. 1). On peut également provoquer cette induc-

tion d'une activité plus importante par d'autres traitements tels que l'exposition à une teneur importante en urée ou la digestion brève par l'enzyme protéolytique, trypsine...

Cette augmentation de l'activité à pH 7,0 est accompagnée d'une diminution de l'activité à pH 5,0 qui conduit à un aplatissement provisoire de la courbe de l'activité en fonction du pH. Ce phénomène a été interprété comme la preuve d'un changement de la conformation, c'est-à-dire de la structure dans l'espace, de la protéine. En effet, LERNER et MAYER (1975) ont mis en évidence ce changement de la conformation d'une molécule par la mesure directe du rayon de STOKES; à pH 5 le rayon est environ 80 A et à pH 5, il est d'environ 30 A.

Ce changement de la configuration qui est la conséquence du pH acide intervient selon toute vraisemblance au cours du pressurage des raisins. L'enzyme à cette étape de la vinification est brutalement exposée à un milieu acide qui modifie certaines de ses propriétés.

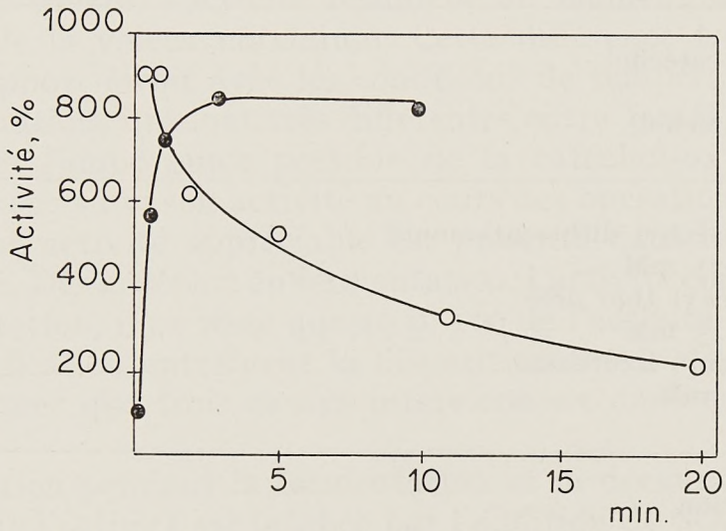


FIG. 1. — *Augmentation de l'activité de la catéchol-oxydase à pH 7,0 après incubation à pH 5,0 et son évolution après un tel traitement* (LERNER *et al.* 1972).

●——— Activité à pH 7 après préincubation à pH 5 pendant des périodes de temps différentes.

○——— Évolution de l'activité pendant l'incubation à pH 7,0 après passage à pH 5 pendant 3 mn.

Une autre propriété importante, qui est également modifiée par un traitement acide, est la vitesse de l'oxydation des substrats en milieu dont la teneur en oxygène est basse; en effet la variation de pH entraîne une augmentation importante de l'affinité pour l'oxygène. L'oxygène est souvent le facteur limitant de l'activité de l'enzyme de telle sorte que la réaction doit se dérouler d'une façon plus rapide aussitôt après le foulage des raisins.

Changement de la conformation de l'enzyme au cours de la vinification

Nous avons ensuite recherché si le « pH shock » avait aussi une influence sur l'enzyme présente dans le jus de raisin. Nous avons trouvé que l'enzyme présente soit dans le jus de raisin traité avec SO_2, soit dans le moût après un jour de fermentation, est moins sensible au « pH shock » que l'enzyme présente dans le jus frais; la modification de l'activité en fonction du pH est également moins marquée.

Ainsi, ces résultats indiquent que de tels changements de conformation se passent certainement au cours de la vinification et que ces changements modifient les propriétés de l'enzyme. Une preuve supplémentaire de tels changements est apportée par l'électrophorèse sur gel. Dans deux des trois cépages étudiés (Carignan, Clairette et Sémillon) nous avons remarqué un changement important du diagramme électrophorétique, en particulier après un jour de fermentation. Dans les jus des raisins issus de cépage Sémillon seulement, on ne remarque pas de tels changements. Les déterminations du pK de l'enzyme par la technique d'électro-focalisation, avant et après la fermentation, nous ont montré que le pK augmente; ce résultat confirme que les propriétés de l'enzyme changent pendant la fermentation.

Importance de la catéchol-oxydase provenant des raisins pendant la vinification

Si nous considérons maintenant certaines des propriétés de la catéchol-oxydase décrites ci-dessus, il devient possible de faire une estimation préliminaire de son importance pendant la vinification. On sait bien que la catéchol-oxydase, en présence de composés phénoliques, peut conduire à la formation de pigments brunâtres. La formation de tels pigments dans des vins est manifestement indésirable. Cependant, tout au moins dans les premières étapes de la vinification, il est possible qu'une certaine oxydation des composés phénoliques et des tanins intervienne dans l'évolution de la couleur et du goût du vin. Il est donc possible qu'une certaine quantité d'enzyme, présente temporairement, soit souhaitable. La quantité présente pendant le foulage dépend de certains facteurs : cépage, date de la vendange, condition de maturation. Ce qui se passe ensuite dépend de la dose de SO_2 ajoutée, de la rapidité de l'addition de SO_2, des changements des propriétés de l'enzyme et en particulier son affinité pour l'oxygène et sa dépendance à l'égard du pH. Ces deux derniers facteurs peuvent facilement provoquer une augmentation de l'activité de l'enzyme, même quand de l'oxygène supplémentaire est exclus et lorsque le pH du moût n'est pas encore trop bas. Pendant le déroulement de la vinification le pH du jus diminue, l'alcool se forme. Ces deux faits, ajoutés à la précipitation des protéines et à l'inactivité de l'enzyme, provoquent la disparition rapide de l'activité enzymatique du vin. La catéchol-oxydase provenant des raisins n'a plus d'importance dans le vin à la fin de la vinification et elle n'intervient pas dans sa couleur. Nous voudrions cependant suggérer qu'il est possible que l'activité initiale de la catéchol-oxydase dans les moûts, en particulier ceux issus des vendanges rouges, intervienne d'une manière importante dans la qualité du vin. On peut résoudre cette question par une étude systématique de l'activité de la catéchol-oxydase des raisins immédiatement après les vendanges à l'aide d'une technique simple utilisable sur place que nous avons développée dans notre laboratoire.

La Laccase dans les vins

Les travaux de Laborde (1895, 1897) et de Bertrand (1890) laissent prévoir l'existence d'une enzyme secrétée par *Botrytis cinerea* mais l'importance possible de cette enzyme, apparemment une oxydase, n'avait jamais été dégagée. Dubernet et Ribéreau-Gayon (1973, 1975) en ont effectué une étude détaillée; ils ont montré qu'effectivement une oxydase tire son origine du champignon pathogène et que

TABLEAU 2

Propriétés de la laccase de Botrytis cinerea
(DUBERNET *et al.* 1976; MAYER : résultats non publiés)

Ph optimum d'activité	4,0-4,7
Km méthyl-4 pyrocatéchol	0,045 mM
p. crésol	0,67 mM
hydroquinane	0,19 mM
O_2 (hydroquinone)	25 p. 100
INHIBITION HCN 1 mM	25
p. 100 di éthyl thiocarbamate 1 mM	0
phényl hydrazine 0,5 mM	0
Pic d'électrofocalisation	pH 2,5
Nombre de bandes par électrophorèse sur acrylamine	2
Poids moléculaire	56.000
Atomes de cu /molécule	au moins 1

cette enzyme intervient au cours de la vinification. Les études ultérieures ont rapidement montré que cette enzyme n'est pas une catéchol-oxydase mais appartient à la famille des laccases dont les propriétés particulières sont :

1) l'attaque des ortho et para diphénols ainsi que de l'acide ascorbique;

2) l'optimum d'activité à pH acide;

3) la résistance aux inhibiteurs de la catéchol-oxydase, par exemple la phénylhydrazine.

L'enzyme a été étudiée et quelques-unes de ses caractéristiques sont données par le tableau 2 (DUBERNET *et al.* 1976).

La comparaison des tableaux 1 et 2 montre clairement que l'enzyme qui tire son origine du champignon est très différente de celle du raisin; il faut remarquer en particulier son optimum d'activité à pH bas, sa grande stabilité en milieu acide et son affinité importante pour les ortho-diphénols.

L'enzyme du raisin est inactivée dans la zone du pH3 à pH 3,5 alors que celle du champignon reste stable dans cette zone; par conséquent l'activité de l'enzyme provenant, dans les raisins du champignon pathogène présent se retrouve dans les moûts et dans les vins eux-mêmes. Puisque cette enzyme possède une grande affinité pour les ortho-phénols, ceux-ci seront rapidement oxydés dès que de l'oxygène sera présent dans le vin.

DUBERNET (1974) a montré que plus le degré d'infection par *Botrytis* augmente, plus il y a de laccase dans les moûts et même dans les vins. Il a montré également que l'addition de 50 mg /l de SO_2 au moût ne provoque qu'une inhibition de 10 p. 100 de l'activité de l'enzyme et même pour 150 mg /l l'inhibition est de l'ordre de 20 p. 100. L'addition de SO_2 au vin à l'abri de l'air provoque une inhibition et /ou une destruction de l'activité de l'enzyme au bout de six jours. Cependant, l'inhibition même dans ce cas n'est que partielle et dépend de la nature du vin. Il est probable que dans les vins dont les teneurs en composés phénoliques sont importantes, une grande partie de SO_2 est combinée à ces composés phénoliques; aussi l'inhibition de l'activité de la laccase n'est que partielle. En présence d'air, la laccase

provoque une décoloration importante des vins (DUBERNET, 1974). La laccase possède le pouvoir d'oxyder plusieurs substrats phénoliques dont les anthocyanes; aussi la décoloration en présence de cette enzyme n'est pas un fait surprenant.

Les faits importants à retenir au sujet de la laccase du champignon sont :

— qu'elle est une enzyme extra-cellulaire qui se retrouve dans les jus de raisins;

— qu'elle est très stable en milieu acide et instable au-dessus de pH 7,5;

— qu'elle est beaucoup moins sensible à SO_2 que la catéchol-oxydase du raisin.

TABLEAU 3

Composition en acides aminés de la catéchol-oxydase du raisin et de la laccase de Botrytis cinerea (KIDRON 1976; MAYER : résultats non publiés)

1) Teneur relative en acides aminés (arginine = 1).
2) Nombre de résidus acides-aminés : molécules (sans tenir compte de la teneur en sucre de la laccase).

	du Raisin		de *Botrytis cinerea*	
	I	II	I	II
Lysine	1,68	36		
Histidine	0,54	12	2,4	6
Arginine	1,0	22	1	2
Acide aspartique	3,47	78	19,3	47
Thréonine	1,70	36	29,6	72
Sérine	2,18	48	34,8	85
Acide glutamique	2,46	56	10,4	25
Proline	2,38	52	10,1	25
Glycine	2,48	44	15,8	39
Alanine	2,28	50	27,2	66
Cystéine	présent	1,2	0,58	1
Valine	1,5	36	10,7	26
Méthionine	b	—	1,3	3
Isoleucine	1,45	34	9,3	23
Leucine	2,16	42	15,9	39
Tyrosine	1,6	36	4,6	11
Phénylalanine	1,09	24	4,1	10
Glucosamine	absent		6,4	

Le tryptophane n'a pas été retrouvé dans l'hydrolysat.
a = non séparé; b = non décelé.

A cause de l'ensemble de ces propriétés, la présence de cette enzyme constitue un sérieux problème à l'égard de la qualité du vin chaque fois que l'on a affaire à des vendanges parasitées par *Botrytis cinerea*. Dans les climats chauds, tels que celui d'Israël et probablement celui de la Californie, il pleut peu ou pas du tout au cours de la maturation des raisins et donc l'intervention du *Botrytis* est un phénomène rare.

La structure moléculaire de la laccase de *Botrytis* n'est pas sans intérêt. Le tableau 3 montre la comparaison des compositions en acides aminés de la catéchol-oxydase du raisin et de la laccase de *Botrytis*. La différence entre les deux enzymes est très importante; par rapport à l'enzyme du raisin la laccase contient peu d'acides aminés basiques. Elle est riche en sérine et en tréonine; enfin elle contient une quantité plus importante de méthionine.

Ces propriétés sont, sans aucun doute, en rapport étroit avec sa grande stabilité en milieu acide. La laccase est une glycoprotéine et ce caractère peut aussi lui conférer une grande stabilité dans certaines circonstances. Il est absolument évident que la laccase est une protéine tout à fait particulière et il est tout indiqué de l'étudier plus profondément. Il est possible qu'elle ait une grande importance dans les raisins parasités par *Botrytis*. L'enzyme est stable dans les conditions que l'on trouve dans le vin, elle est résistante à SO_2 et aux autres inhibiteurs et elle possède une grande affinité pour les substrats phénoliques. L'ensemble de ces propriétés entraîne donc dans tous les cas, le brunissement de la couleur des vins issus de vendanges pourries. Il est possible qu'il soit nécessaire de trouver un nouvel inhibiteur efficace, en particulier si l'usage de SO_2 doit être limité dans l'avenir.

Conclusion

L'importance dans le vin de la catéchol-oxydase semble être limitée aux étapes initiales de la vinification. Il est possible qu'elle soit utile tout à fait au début. Il est possible aussi qu'elle puisse servir d'indicateur supplémentaire de la qualité des raisins au moment des vendanges.

Par contre, la laccase de *Botrytis* intervient aux différentes étapes de la vinification et elle semble être nuisible dans tous les cas.

Summary

Grape and wine oxidases

Catechol oxidase present in grapes and during vinification is discribed and its properties summarised. Its importance in determining the quality of wines is assessed and it is concluded that, while initial activity in the must is desirable, its subsequent presence is detrimental. The level of catechol oxidase may serve as indicator for grape quality at harvest. The properties of laccase originating in *Botrytis* are summarized and compared to those of grape catechol oxidase. The reasons for the appearance of this enzyme in the wine are discussed. Its presence is probably always detrimental to wine quality.

Key-words: *Vinification — Catechol oxidase, laccase (Botrytis cinerea) — Properties — Role — Grape.*

Références bibliographiques

BERTRAND G., 1896. *Ann. Agronomiques*, **22**, 116.

DEMEAUX M., BIDAN P., 1967. *Ann. Technol. Agric.*, **16**, 75-79.

DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques, *Thèse 3e cycle*, Université Bordeaux II.

DUBERNET M., RIBÉREAU-GAYON P., 1973. *C. R. Acad. Sci.*, **277**D, 245-470.

DUBERNET M., RIBÉREAU-GAYON P., 1974. *Phytochemistry*, **13**, 1 085-1 087.

DUBERNET M., RIBÉREAU-GAYON P., 1975. *C. R. Acad. Sci.*, **280**D, 1 313.

DUBERNET M., RIBÉREAU-GAYON P., LERNER H. R., HAREL E., MAYER A. M., 1977. *Phytochemistry*, **16** (2), 191-193.

GOUIRAND G., 1895. *C. R. Acad. Sci.*, **120**, 887.

HAREL E., MAYER A. M., 1971. *Phytochemistry*, **10**, 17-22.

HAREL E., MAYER A. M., LEHMAN E., 1973. *Phytochemistry*, **12**, 2 649-2 654.

IVANOV R., IVANOVA A., 1968. *Ann. Technol. Agric.*, **17**, 333-340.

KIDRON M., 1976. *PhD Thesis*, Hebrew University of Jerusalem.

LABORDE J., 1896. *C. R. Acad. Sci.*, **122**, 1 074.

LABORDE J., 1897. *C. R. Acad. Sci.*, **125**, 248.

LERNER H. R., MAYER A. M., 1975. *Phytochemistry*, **14**, 1 955-1 957.

LERNER H. R., MAYER A. M., 1976. *Phytochemistry*, **15**, 57-60.

LERNER H. R., HAREL E., LEHMAN E., MAYER A. M., 1971. *Phytochemistry*, **10**, 2 637-2 640.

LERNER H. R., MAYER A. M., HAREL E., 1972. *Phytochemistry*, **11**, 2 415-2 421.

LERNER H. R., MAYER A. M., HAREL E., 1974. *Phytochemistry*, **13**, 397-401.

LEVINE W. G., 1966. *In The Biochemistry of copper*, J. PEISAH, P. AISEN et W. E. BLUMBERG ed., Acad. Press, New York, p. 371-387.

MONTE DORO G., 1969. *Industrie Agrarie*, **7**, 259-267.

MORKOVICH M. S., RIKHTER A. G., 1965. *Chem. Abst.*, **62**, 13802.

POUX C., 1966. *Ann. Technol. Agric.*, **15**, 149-158.

RADLER F., TOROKFALVY E., 1973. *Z. Lebensmit. u. Forsch.*, **152**, 38-41.

TRAVERSO-RUEDA S. et SINGLETON V. L., 1973. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **24**, 103-109.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 161-171

Maîtrise des activités enzymatiques au cours des phénomènes préfermentaires

G. MARTEAU (†)

Chaire de Technologie-Œnologie,
E.N.S.A. Montpellier (France)

Résumé

La maîtrise des activités enzymatiques au cours de la phase préfermentaire peut être accrue du fait des connaissances nouvelles accumulées ces dernières années sur les propriétés des enzymes en cause :

a) Les enzymes présents dans la vendange : l'auteur passe en revue un certain nombre de facteurs technologiques exploitables pour assurer la maîtrise de leur activité : date et conditions de récolte, modalités d'extraction du moût, traitements par le SO_2 et la bentonite, centrifugation et surtout traitements thermiques de la vendange ou du moût.

b) Les enzymes exogènes : l'auteur se limitant ici à l'intervention par les enzymes pectolytiques et rappelant les objectifs technologiques recherchés met particulièrement l'accent sur leurs effets secondaires et sur la participation à leur action d'activités non pectolytiques. L'auteur évoque enfin les perspectives d'utilisation d'enzymes immobilisées et le problème doctrinal que pourrait poser la systématisation par cette voie de l'intervention enzymatique.

Mots clés : *Vendange — Phase préfermentaire — Facteurs technologiques — Enzymes pectolytiques — Interactions.*

Les activités en cause

Lors du Symposium de Bordeaux tenu en 1967, nous avions constaté combien la phase préfermentaire de la vinification était dominée par la manifestation d'un certain nombre d'activités enzymatiques qu'il appartient à l'œnologue de savoir maîtriser, ce qui suppose tout d'abord, une connaissance actualisée de leurs propriétés. Cette maîtrise suppose l'inhibition éventuelle des activités les plus nuisibles tout en permettant la manifestation des activités utiles; elle peut comporter, nous verrons dans quelles limites, l'utilisation de préparations enzymatiques exogènes susceptibles de renforcer les activités naturelles. La démarche technolo-

gique doit s'inspirer des connaissances nouvellement acquises au cours des dix dernières années sur des enzymes jusqu'alors insuffisamment connues; oxydoréductases décrites dans le rapport du Pr. MAYER, protéases (CORDONNIER et DUGAL 1968), enzymes pectolytiques (MARTEAU, 1967, 1972), enzymes génératrices d'arôme (CORDONNIER *et al.* 1975).

La technique préfermentaire et la maîtrise des activités enzymatiques

Choix de la date de récolte

La maturation conduit à un accroissement très notable de l'activité protéase ainsi que du complexe des activités pectolytiques, mais par contre, à un abaissement de l'activité de la tyrosinase. Logiquement, par conséquent, le développement de la maturation conduit à des moûts moins avides d'oxygène mais plus aptes à une clarification rapide; les enzymes cependant ne sont pas les seuls facteurs en cause.

Il arrive, malheureusement trop souvent que les conditions climatiques conduisent vers l'époque de la maturité, à un développement de pourriture qui accroît considérablement les activités protéases et pectolytiques et, plutôt qu'à un accroissement global, comme on le pensait autrefois des activités oxydoréductases, à l'apparition de la laccase avec toutes les conséquences néfastes qui en résultent (DUBERNET, 1974), dues notamment à sa longue persistance dans le vin, en l'absence de tout traitement approprié.

Conditions de la récolte

Il est bien connu que des conditions de récoltes défectueuses, conduisant en particulier à un écrasement partiel prématuré des raisins ou au mélange dans leur masse d'une proportion de feuilles appréciable, déclenchent prématurément des réactions rendues possibles par la mise en présence d'enzymes et de leurs substrats.

Compte tenu du rôle de l'oxygène dans les transformations les plus nuisibles (oxydation des composés phénoliques, formation d'hexénol et d'hexanal à partir des acides linoléiques et linoléniques) (CORDONNIER, 1974), les effets nuisibles sont surtout révélés lors d'une action très prolongée de l'oxygène et particulièrement lorsque un long délai sépare la récolte de la mise en œuvre de la vendange. Il en résulte des conséquences très pratiques souvent soulignées, en ce qui concerne notamment l'aménagement des postes de réception et le fonctionnement éventuel des caves pendant la période nocturne (DELLENBACH, 1975).

Conditions d'extraction

Il faut être conscient de la rapidité avec laquelle, dès le foulage de la vendange, vont s'accomplir d'une façon extrêmement rapide, les réactions nuisibles à peine amorcées dans la phase précédente. En présence d'air, les 8 ml d'oxygène qui saturent un litre de moût à 25 °C sont consommés dans un délai de l'ordre de

4 minutes, avec toutes les conséquences qu'il est inutile de rappeler ici (DUBERNET, 1974).

En ce qui concerne la vinification en blanc, la plus concernée par les effets nuisibles de l'oxydation, la maîtrise des activités enzymatiques s'appuie sur les bases suivantes :

— Limitation du taux d'oxydo-réductases et de leurs substrats polyphénoliques par réduction du contrat entre le moût et les matières solides.

Le pressurage direct des grains entiers constitue le paroxysme de cette préoccupation, à l'opposé de laquelle se situent les techniques développées dans certains pays, comportant au contraire une courte macération contrôlée du moût et des matières solides, justifiée en vue du développement des arômes; il faut, tout particulièrement dans ce cas, demander au SO_2 la protection nécessaire.

— Accélération du processus d'extraction du moût qui condamne de ce fait, de plus en plus, l'égouttage statique mais conduit plutôt à l'adoption de dispositifs continus qui constituent un compromis entre ces dernières et les dispositifs mécaniques tels que les égouttoirs à cylindres rotatifs qui maltraitent par trop la vendange.

— Mise à l'écart des moûts issus des dernières fractions du pressurage à la fois enrichies en oxydo-réductases et en leurs substrats.

— Élimination de l'oxygène en tant que substrat, ce qui peut conduire à l'utilisation précoce des gaz inertes tels que l'azote ou le CO_2. C'est à ce propos que certains échecs peuvent être expliqués grâce à une meilleure connaissance des propriétés des enzymes en cause (DUBERNET, 1974) : il a en effet été constaté que les moûts ainsi protégés, avec les conséquences bénéfiques qui peuvent en résulter, donnent parfois des vins beaucoup plus fragiles que d'autres, vis-à-vis des oxydations ultérieures. Il faut alors se rappeler l'inhibition de la tyrosinase du raisin par les produits de la réaction qu'elle catalyse. La protection précoce vis-à-vis de l'oxydation entraîne donc une persistance plus longue de l'activité tyrosinase dans les moûts et dans les vins qui en sont issus, assurant donc la possibilité de réactions oxydasiques tardives.

C'est alors qu'il convient de se préoccuper de la chronologie de plusieurs types de réactions enzymatiques. L'action des enzymes pectolytiques en effet, assure en même temps que le dépôt des bourbes légères, un véritable collage naturel du moût entraînant les produits colorés issus de la transformation des polyphénols. Lorsque le processus oxydatif se manifeste postérieurement à ce mécanisme de clarification spontanée, les composés colorés issus de l'oxydation des polyphénols demeurent davantage dans le milieu.

L'anhydride sulfureux

Le SO_2 demeure le moyen le plus spécifique d'intervention vis-à-vis des oxydo-réductases nuisibles. Il est inutile d'insister sur ce qui est déjà bien acquis, la nécessité vis-à-vis de la tyrosinase du raisin, de l'incorporer très précocement et de façon homogène, de façon à ce qu'il intervienne avant d'être instantanément détruit par les quinones préformées dans le milieu; la technologie pratique a beaucoup progressé dans ce sens. Le fait nouveau, introduit par les travaux (de DUBERNET 1974 et RIBÉREAU-GAYON, 1975), résulte par contre de la très grande résistance à ce stade de la laccase du *Botrytis*. 80 mg /l de SO_2 ajouté à la vendange assurent la destruction totale de l'activité tyrosinase, mais ont peu d'action sur l'activité laccase qui n'est éliminée par cette dose que lors d'une addition faite au vin.

Bentonite et centrifugation

Il ressort des données de DUBERNET (1974) que la bentonite agit préférentiellement sur la fraction soluble de l'activité tyrosinase, qu'un traitement à raison de 100 g/hl pourrait éliminer. On peut au contraire attendre logiquement d'un débourrage accéléré par centrifugation, l'élimination préférentielle de la fraction liée de la tyrosinase. Il semblerait donc que ces deux traitements soient complémentaires l'un de l'autre.

En ce qui concerne l'activité laccase entièrement soluble, la centrifugation ne peut logiquement constituer un remède très efficace; quant à la bentonite dont l'inefficacité a été prouvée sur la vendange entière, il serait bon de posséder des données expérimentales susceptibles de préciser son action sur la laccase des moûts de vendange atteinte de pourriture.

Les hautes températures

Est-il possible d'exploiter la température pour sélectionner les activités utiles au détriment des activités nuisibles?

Un raisonnement théorique dans ce domaine peut exploiter les paramètres classiques exprimant la régression des activités dans les zones de températures conduisant à la dénaturation des protéines enzymatiques (MARTEAU *et al.* 1973-1974).

Il s'agit :

— Du temps de réduction décimale D_t^0 qui exprime la valeur constante du temps de maintient à t °C nécessaire pour diminuer 10 fois l'activité initiale (fig. 1) ce qui exprime donc la nécessité pratique d'être en mesure d'adapter le temps de chauffage à l'importance de l'activité enzymatique à détruire. Selon par exemple les données de DEMEAUX et BIDAN (1967), la valeur de D_{65}^0 relative à la polyphénoloxydase du raisin pour un jus centrifugé de pH 3,3 serait de l'ordre de 8 minutes.

— $F_t^0 = n\ D_t^0$ exprime sur le plan pratique, compte tenu de l'activité enzymatique initiale, le temps de maintien à la température t°C, nécessaire pour ramener cette activité à un niveau négligeable. On adopte souvent comme valeur moyenne $n = 4$, ce qui veut dire que l'on estime le niveau de destruction de l'activité pratiquement suffisant lorsque cette activité a été diminuée 10 000 fois.

— La variation de F_t^0 en fonction de la température est définie par un nouveau paramètre Z dont la valeur, en principe constante dans la zone de température létale, représente l'élévation de température nécessaire pour diminuer 10 fois la valeur de F_i^0. donc pour accroître 10 fois l'efficacité du processus de destruction.

La figure 1 exprime sur ces bases la thermorésistance de la polyphénoloxydase du raisin déduite des données de DEMEAUX et BIDAN (1967) et de la protéase du raisin, déduite des données de CORDONNIER (1974).

S'il est utile à notre avis de se référer à de telles données théoriques pour mieux concevoir le rôle de la température vis-à-vis des activités enzymatiques, il faut bien reconnaître que nous sommes bien loin de posséder tous les éléments qui permettraient d'aboutir à un modèle exploitable.

Enonçons rapidement quelques-unes des difficultés d'application de ce dernier :

— Ce que nous venons de voir s'applique à une enzyme donnée parfaitement définie, dans un milieu défini, par son pH en particulier.

Qu'en est il lorsque plusieurs activités enzymatiques s'associent de façon

interdépendante pour conduire à une transformation donnée? C'est en particulier le cas des enzymes pectolytiques.

— De nombreuses enzymes se trouvent dans le moût ou la vendange sous forme liée; c'est en particulier le cas d'une fraction importante de la tyrosinase. Or ces formes sont généralement beaucoup plus résistantes au facteur thermique que les formes libres.

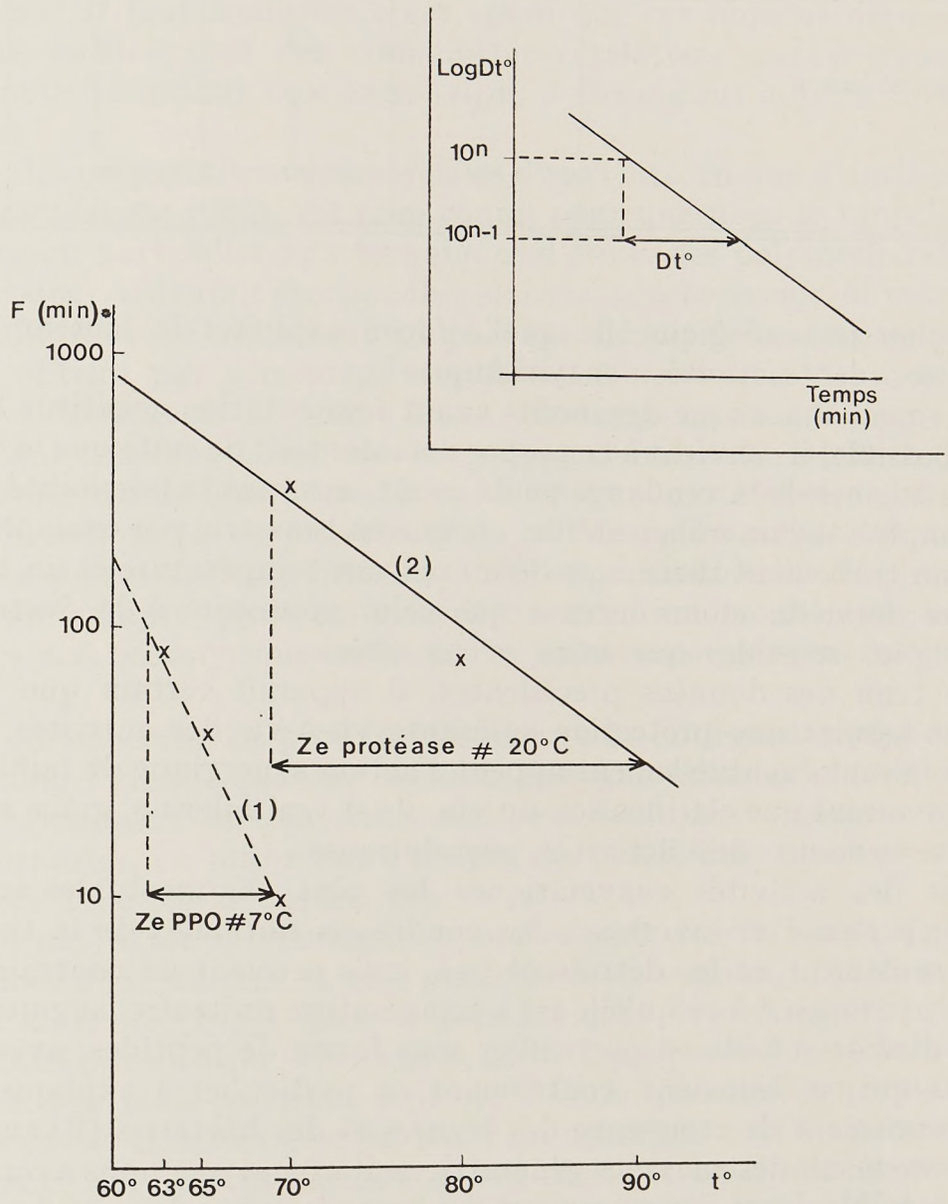


FIG. 1. — *Conditions d'inactivation*

1. De la polyphénoloxydase du raisin (DEMEAUX *et al.*, 1967).
2. De l'activité protéase du raisin (CORDONNIER, 1974)

$F_{to} = 4D_{to}$ = temps de maintien à to_8 nécessaire pour diminuer 10 000 fois l'activité initiale.

— Le pH du milieu joue un rôle particulièrement important sur la thermorésistance des enzymes; il y a donc lieu d'en tenir compte, même dans le cadre des variations relativement faibles auxquelles on assiste dans le cas de la vendange. A titre d'exemple, le tableau 1 montre l'incidence du pH sur la clarification des moûts après chauffage.

— L'élévation de la température peut conditionner des variations de l'efficacité d'activateurs ou d'inhibiteurs des activités enzymatiques; il est vraisemblable en particulier que les tanins jouent à cet égard un rôle important.

TABLEAU I

Délai de clarification spontanée du moût
(en jours)

pH	3,0	3,2	3,4	3,6
Témoins	1	1	1	1
Après chauffage 20 mn à :				
60°C	6	6	3	2
65 °C	10	6	3	3
70 °C	70	70	20	20

Sur le plan technologique, de quelle façon exploiter le facteur thermique, pour maîtriser les activités enzymatiques?

Le traitement thermique des moûts avant fermentation constitue la première application possible; il convient à ce propos de noter tout de suite que la destruction des microorganismes de la vendange ou du moût, assurant la possibilité de fermentations accomplies sur un milieu stérile, comme en brasserie par exemple, nécessite en principe un traitement thermique défini par une température et un temps d'action de cette dernière, moins intense que celui nécessaire à la destruction des enzymes les plus sensibles que nous avons citées.

Compte tenu des données précédentes, il apparaît certain que l'on puisse généralement assurer une protection suffisante vis-à-vis des activités oxydatives nuisibles, en faisant éventuellement appel à l'action synergique de faibles doses de SO_2 tout en assurant une clarification du vin, il est vrai ralentie, grâce au maintien à un niveau suffisant des activités pectolytiques.

Vis-à-vis des activités enzymatiques les plus thermostables actuellement inventoriées (protéase et invertase), les conditions normales de la thermovinification, non seulement ne les détruisent pas, mais peuvent au contraire accroître leur activité par rapport à ce qu'elle est à température ordinaire, augmentant de ce fait le taux d'azote soluble en particulier sous forme de peptides, avec toutes les conséquences qui en découlent, contribuant en particulier à expliquer l'accroissement du rendement de croissance des levures et des bactéries (Barre, 1972).

Il demeure le cas des enzymes génératrices d'arômes que nous avons évoquées plus haut. Le faible degré d'avancement des connaissances dans ce domaine, peut constituer dans certains cas (celui par exemple de vendanges saines), un argument favorable à la pratique de la thermovinification avec chauffage partiel de la vendange qui permet de restituer au moût une partie du potentiel enzymatique du raisin.

Utilisation d'enzymes exogènes

Utilisation en vue d'une meilleure extraction du moût ou du vin

Le résultat attendu est une dégradation des parois cellulaires s'accompagnant en particulier d'une solubilisation des formes insolubles de pectines localisées dans ces dernières.

TAKOV et VELICHKOV (1972) ont montré en outre l'action synergique d'une cellulase associée aux enzymes pectolytiques. MONTEDORO et BERTUCCIOLI (1975), dans un important travail, ont étudié diverses associations des enzymes pectolytiques avec des cellulases, hemicellulases, xylanases et protéases; le meilleur rendement en moût de goutte étant donné par l'association cellulase, hémicellulase et protéase. De telles études pourront conduire dans l'avenir à optimiser davantage le spectre enzymatique des préparations commerciales et son adaptation à chaque cas particulier. Il faut souligner à cet égard que cet objectif dépend en grande partie d'une amélioration des connaissances relatives aux polysaccharides du raisin à laquelle USSEGLIO-TOMASSET (1976) a récemment apporté une importante contribution.

Le rôle des préparations commerciales d'enzymes, en vue d'améliorer le rendement d'extraction du moût, est trop connu pour que nous le rappelions ici. Par contre, grâce en particulier aux techniques d'étude des polysaccharides que nous venons d'évoquer, il devrait être possible, dans un proche avenir, de mieux connaître l'aspect qualitatif de ce traitement qui peut être déduit de la composition comparée d'un moût obtenu par pressurage normal et d'un moût obtenu avec le même rendement d'extraction, à partir d'une vendange enzymée.

En ce qui concerne la nature des polysaccharides du moût et du vin et le produits terminaux de leur dégradation, DATOUNACHVILI *et al.* (1976) ont récemment mis l'accent sur la responsabilité de certains polysaccharides, résultant par exemple d'un pressurage trop intense, dans l'apparition de troubles, venus rompre la stabilité du vin après plusieurs mois de conservation, troubles vis-à-vis desquels des enzymes non pectolytiques telle que la β-glucanase, peuvent avoir une grande efficacité.

En ce qui concerne les produits terminaux de la dégradation, l'accumulation en plus ou moins grande quantité selon les enzymes mises en œuvre, de galactose, mannose, rhamnose et surtout arabinose, peut avoir des conséquences organoleptiques importantes, en raison par exemple des possibilités ultérieures de réaction de ces sucres avec les acides aminés.

Également, l'acide galacturonique pour sa part, dont le taux est généralement très accru lors d'un traitement enzymatique de la vendange, peut avoir un rôle, montré par CASTINO (1973), dans le brunissement de certains vins blancs.

N'oublions pas bien sûr le méthanol, en tant que produit final de la dégradation des pectines; son taux potentiel dépendant de la quantité de pectine solubilisée à partir des parois cellulaires est évidemment accru par tout traitement réalisé sur la vendange, ce qui ne veut pas dire que ce taux potentiel soit forcément entièrement libéré dans le vin. A ce propos, on exagère trop souvent l'impact toxicologique de cet accroissement du taux de méthanol qui, de toutes façons pour un même cépage avec ou sans traitement enzymatique, est loin d'atteindre en vinification en blanc, en rosé ou en vin de café, le taux atteint lors d'une vinification en rouge classique sans traitement.

Le problème de l'incidence du traitement par les enzymes sur la coloration des vins se pose tout d'abord au niveau de la vinification en blanc que l'on s'efforce en France par exemple, d'obtenir en limitant au maximum le contact entre le moût et les matières solides, ce qui n'autorise pas un traitement enzymatique efficace de la vendange foulée.

Au contraire, dans certains pays, assez nombreux, le souci en particulier d'extraire à partir des pellicules certains constituants au précurseur de l'arôme, conduit à des courtes macérations d'une durée contrôlée qui peut justifier un traitement enzymatique. Selon FERENCZI et ASVANY (1975), des durées de macéra-

tion de l'ordre de 2 heures, suffiraient à obtenir les effets escomptés sur la facilité d'extraction du moût.

Ne peut-on s'attendre dans ces conditions, à un accroissement des manifestations oxydatives et en particulier à un brunissement des vins, résultant d'une extraction accrue à partir des matériaux solides de la vendange, à la fois des oxydoréductases et de leurs substrats polyphénoliques. Le tableau 2 dû à OLIVIERI (1975) montre qu'en ce qui concerne les activités des oxydoréductases, il n'en est rien, bien au contraire. De toutes façons, selon FERENCZI et ASVANY (1975), des doses de l'ordre de 25 mg de SO_2 libre par litre permettent de rendre nulle l'augmentation de coloration par rapport à celle d'un témoin non traité.

TABLEAU 2

Activités oxydasiques du moût de raisin
(Substrat catéchol; Mmol O_2 consommés/ml/min)

	Vendange témoin	Vendange témoin traitée aux enzymes pectolytiques	
		Préparation 1	Préparation 2
Vendange saine :			
Moût de goutte	0,067	0,056	0,041
Moût de presse	0,120	0,108	0,090
Vendange pourrie :			
Moût de goutte	0,036	0,027	0,019
Moût de presse	0,023	0,026	0,018

En ce qui concerne les vins rosés, de café ou encore de macération à chaud conduite à des températures compatibles avec la stabilité des enzymes ajoutées et n'excédant pas par exemple 55°C, quelles sont les conséquences sur la couleur des vins d'un traitement enzymatique?

Les observations à ce sujet sont assez divergentes; elles dépendent du cépage, des conditions de la macération favorisant plus ou moins la diffusion des anthocyanes et aussi, très largement, du spectre enzymatique de la préparation; les travaux de MONTEDORI et BERTUCCIOLO (1975) mettent en évidence par exemple le rôle très favorable à cet égard, de l'association des activités cellulase-pectinase ou cellulase, xylanase, protéase, ajoutées aux enzymes pectolytiques. Le gain de couleur lors de macérations conduites aux environs de 50 °C peut être parfois considérable.

Mais un autre point important signalé assez souvent est une relative instabilité des anthocyanes dans les vins issus des vendanges traitées, qui très souvent deviennent alors moins abondantes que dans le témoin; ce phénomène s'accompagne d'une augmentation du rapport de nuance du vin $\frac{D\ 420}{D\ 520}$ pouvant être jugé favorable ou défavorable selon que l'on souhaite ou non disposer plus tôt de vins de

caractère plus adulte. La cause de ce phénomène, selon MONTEDORO et BERTUCCIOLI (1975), se manifeste surtout à des températures supérieures à 25 °C et sous l'action des pectinases proprement dites, n'est pas élucidée; selon les auteurs précités, elle pourrait résulter de l'action parasite d'une glucosidase.

Exploitation de l'action clarifiante des préparations pectolytiques

Dans quelles conditions, au cours de la phase préfermentaire, les problèmes de clarification peuvent-ils justifier une intervention enzymatique?

C'est tout d'abord le cas des moûts dont la fermentation donne des vins inclarifiables dans un délai raisonnable, tels par exemple, certains moûts issus d'un chauffage de la vendange faisant appel à des températures de l'ordre de 70 °C et au-delà.

Les vinifications en blanc et en rosé peuvent parfois justifier des traitements portant sur des moûts possédant un équipement enzymatique naturel normal, en vue d'accélérer le débourbage et de mieux protéger les moûts vis-à-vis des oxydo-réductases liées aux constituants du trouble; nous avons vu cependant plus haut, le danger éventuel de manifestations oxydatives postérieures au processus de la clarification et au dépôt des bourbes légères.

Rappelons ici rapidement que la dégradation des pectines peut emprunter deux voies principales : la première passe par la déméthoxylation préalable de la molécule grâce à une pectine-estérase (P.E.) suivie de son fractionnement rapide sous l'effet d'une endopolygalacturonase (endo-P.G.). L'autre voie conduit à une rupture directe des liaisons glucosidiques 1-4, sous l'action dominante semble-t-il actuellement, d'une endo-pectine transéliminase (endo P.T.E.), selon le mécanisme mis en évidence par ALBERSCHEIM *et al.* (1960), assurant la rupture de la liaison glucosidique non pas par hydrolyse mais par migration d'un proton avec formation d'une double liaison.

Dans les préparations actuelles, le premier de ces deux mécanismes doit encore jouer un rôle important, car l'acide pectique est beaucoup plus vite attaqué par elles que la pectine non déméthoxylée; il est donc logique de penser que la P.E. du raisin, contribue dans ce cas à l'efficacité technologique des préparations; il faudrait en tenir compte dans le cas où l'on souhaiterait optimiser le spectre enzymatique des préparations, en particulier le rapport des activités P.E. /P.G.; une intéressante étude de DAHODWOLA *et al.* du comportement cinétique d'une association entre la P.E. de la tomate et une endo-P.G. fongique, apporte à ce sujet un modèle de raisonnement intéressant.

La deuxième des voies énoncées plus haut, celle qui exploite la transélimination, indépendante d'une action préalable de la P.E. joue incontestablement un rôle important dans un certain nombre de préparations; elle peut conduire, comme nous l'avons souligné (MARTEAU, 1972) à induire la clarification avec une moindre libération du méthanol.

Utilisation des enzymes immobilisées

Depuis quelques années, un très grand nombre d'études ont été consacrées à l'utilisation d'enzymes immobilisées (DURAND et BAUDRAS, 1975; DURAND et MONSAN, 1974; OLSON et COONEY, 1974).

Le principal avantage attendu de l'immobilisation, réside dans la possibilité

de réutilisation des enzymes après qu'elles aient assumé la transformation souhaitée et donc d'assurer la possibilité d'un traitement continu dans un réacteur homogène ou hétérogène. La mise en œuvre d'un tel procédé, si séduisant sur le plan des principes, présente cependant un certain nombre de difficultés. Par exemple, malgré l'accroissement de la stabilité des enzymes résultant de l'immobilisation, l'activité globale du réacteur tend à décroître.

En œnologie, pendant la phase préfermentaire, il est possible d'atteindre, par traitement continu du moût sur un réacteur à enzymes fixées, les objectifs de l'intervention enzymatique que nous avons précédemment définis. Déjà DATOUNACHVILI *et al.* (1975) ont proposé un modèle technologique de chaîne de traitement comportant le passage successif du moût dans un réacteur pectolytique puis dans un réacteur protéasique avec asservissement du débit aux contrôles respectifs permanents de la viscosité, de la turbidité et de la teneur en azote protéique du moût traité.

Mais la maîtrise des processus enzymatiques, doit-elle pousser jusque-là l'intervention enzymatique ? Si l'on se réfère uniquement à la logique technologique qui conduit à l'optimisation de la composition du vin dans le respect de son caractère naturel, la réponse peut être affirmative puisque cette intervention ne comporte pas d'addition de produit étranger au raisin. Elle se justifie de plus en vue de ne pas rompre la continuité du processus de la vinification.

Cependant certains ont une notion plus restrictive de la notion de vin naturel et concevront plus difficilement une intervention enzymatique aussi systématique. Pour ces derniers, la maîtrise de la phase préfermentaire consiste essentiellement à maîtriser les activités naturelles du raisin, l'intervention par addition d'enzymes exogènes devant être raisonnées « cas par cas », pour compenser lorsqu'il y a lieu une déficience notoire du milieu naturel.

Le choix lourd de conséquences entre ces deux tendances est doctrinal. C'est pourquoi, il nous apparaît hautement souhaitable qu'un organisme tel que l'Office International du Vin se penche sur le problème pour définir une attitude admise et respectée par tous.

Summary

Control of enzyme activity during the prefermentation phase

The control of enzyme activity during the prefermentation phase can now be improved owing to the studies in the last years about the properties of concerned enzymes.

a) *Enzymes present in the harvested grapes*

A certain number of the exploitable technological factors for assuring control of their activity is reviewed: date and conditions of harvesting, methods of must extraction, SO_2 and bentonite treatments, centrifugation and most important thermal treatments of the grapes of the must.

b) *Exogenous enzymes*

The discussion here is limited to the pectolytic enzymes and in reviewing the studied technological aims emphasizes particularly the secondary effects of these enzymes and their non-pectolytic action. The author then outlines the perspectives for the use of these exogenous enzymes and the doctrinal problem involved in the systematic us of this method or enzyme addition.

Key-words: *Grape harvest — Prefermentation phase — Technological factors — Pectolytic enzymes — Interactions.*

Références bibliographiques

ALBERSCHEIM P., NEUKOM H., DEUEL H., 1960. *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422-6.

BARRE P., 1972. Rapport sur l'élaboration des vins rouges par macération à chaud. I.N.R.A.

CASTINO M., 1973. *Rivista di Vitic. e di Enol.*, **10**, 416-30.

CORDONNIER R., DUGAL A., 1968. *Ann. Technol. Agric.*, **17** (3), 189.

CORDONNIER R., BAYONOVE C., 1974. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **278**, D, 3387.

CORDONNIER R., 1974. *Progr. Agric. Vitic.*, **8**, 286-93; **9**, 320-29.

CORDONNIER R., 1974. *Communication personnelle.*

CORDONNIER R.,, BIRON C., DUGAL A., 1975. *Ann. Technol. Agric.*, **24** (2), 171-92.

DAHODWALA S., ASVANY A., 1975. *Exposé 55e Assemb. Génér. O.I.V., Paris ,S.*

DAROUNACHVILI E. N., 1970. *Bull. O.I.V.*, **470**, 377-88.

DATOUNACHVILI E. N., PAVLIENKO N. M., GAINA B. C., PIETROTCHENOK V. Z., 1975. *Vinod. Vinograd.*, **6**, 54-56.

DATOUNACHVILI E. N., EJOV B. H., VOROBIEBA E. V., RAGUINOV H. K., 1976. *Vinod. i Vinograd.*, **7**, 14-17.

DELLENBACH P., 1975. *55e Assemb. Génér. O.I.V.*, Paris, Sept.

DEMEAUX M., BIDAN P., 1967. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin. *Ann. Technol. agric.*

DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques, Thèse 3e cycle, Université Bordeaux II.

DURAND G., MONSAN ,1974. Les enzymes immobilisées (APRIA, Déc. 1974). *Série synthèses bibliographiques*, n° 5.

DURAND G., BAUDRAS A., 1975. *La Recherche*, **6**, 437-46.

FERENCZI S., ASVANY A., 1975. *Exposé 55e Assemb. Génér. O.I.V.*, Paris, S.

MARTEAU G., 1963. *1er Symp. Int. d'Œnologie*, Bordeaux, 218-33.

MARTEAU G., 1967. *2e Symp. Int. d'Œnologie*, Bordeaux-Cognac, **1**, 71-87.

MARTEAU G., 1967. *Coll. C.N.R.S.*, Paris. Activités enzymatiques et technologie des denrées alimentaires.

MARTEAU G., 1972. *Ann. Technol. Agric.*, **21**, 567-587.

MARTEAU G., OLIVIERI C., ROUBERT J., 1973-74. *Progr. Agric. Vitic.*, **23**, 629; **2**, 56; **5**, 158, **11**; 406; **12**, 434.

MONTEDORO G., BERTUCCIOLI M., 1975. *4e Symp. d'Œnologie*, Valencia (Espagne) Mai.

NOBLE A. C., OUGH C. S., KASIMATIS A. N., 1975. *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**, **3**, 158-63.

OLIVIERI C., 1975. *Progr. Agric. Vitic.*, **7**, 225.

OLIVIERI C., 1975. *Communication personnelle.*

OLSON A. C., COONEY C. L., 1974. Immobilized enzymes in food and Microbiol. processus (Plenum Press).

RIBÉREAU-GAYON P., 1975. *C. R. 4e Symp. Intern. d'Œnologie*, Valencia (Espagne) Mai, 353.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1976. Traité d'Œnologie, *Sciences et techniques du vin*, t. III, Dunod, Paris.

TSAKOV D., 1970. *B.O.I.V.*, **470**, 389-401.

TSAKOV D., VELITCHKOV A., 1972. *Ann. Technol. Agric.*, **21** (4), 589-95.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. *Conn. Vigne Vin*, **10** (2), 193-226.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 173-184

La correction de l'acidité du moût et du vin

G. WURDIG

Institutes für Weinchimie und Gärungsphysiologie der Landeslehr für Weinbau, Gartenbau und Landwirtschaft, Trier (Bundesrepublik Deutschland)

Résumé

L'acidification et la désacidification sont des procédés œnologiques d'égale importance, dont le but est d'adapter aux espérances gustatives du consommateur des teneurs d'acidité variant avec le climat dans les vins d'années différentes. Contrairement à l'acidification, qui ne présente aucun problème, étant donné qu'il n'existe pour cela d'autre moyen que l'addition d'acide, la désacidification peut s'obtenir de différentes façons. La fermentation malo-lactique, que l'on tient souvent pour le procédé le plus naturel, est hors de question pour certaines régions vinicoles où la dégradation bactérienne de l'acide ne se fait ni spontanément ni par ensemencement. C'est là que la désacidification par le carbonate de calcium, méthode aussi utilisée ailleurs, est d'un grand secours; qualitativement, les résultats en sont parfaits, car au contraire de la dégradation acide biologique, l'abaissement de l'acidité peut être calculé avec exactitude sans qu'apparaissent d'effets secondaires (perte de couleur, défauts gustatifs, formation de substances physiologiquement actives, par exemple des amines). Un développement ultérieur de cette méthode de désacidification, appelée Acidex-Désacidification, corrige le taux d'acidité dans des proportions naturelles; lors de cette désacidification, l'acide tartrique aussi bien que l'acide malique sont précipités en un sel double ressemblant à un racémate, composé d'une molécule de tartrate de calcium, d'une molécule de malate de calcium et de huit molécules d'eau de cristallisation. Il faut ici employer un carbonate de calcium d'une grande pureté et d'une constitution particulière.

Mots clés : *Moûts — Vins — Conservation — Acidité — Corrections — Réglementation.*

Introduction

L'acidité est un facteur qui influence les caractères gustatifs et la conservation des vins. Elle doit être comprise entre des limites relativement étroites ce qui n'est pas toujours le cas naturellement. C'est pourquoi les techniques de vinification appliquent depuis longtemps des procédés permettant soit de diminuer, soit d'augmenter l'acidité naturelle jusqu'à la valeur souhaitée. Acidification et désacidi-

fication ont la même utilité; il faut se garder d'accorder plus d'importance à l'une qu'à l'autre. Ceci, exprimé par le règlement C.E.E. 816/70 n'est malheureusement pas bien admis partout.

Selon ce texte, la désacidification est autorisée dans les zones viticoles A, B, C_I et l'acidification dans la zone C_{III}. Dans la zone C_{II} et exceptionnellement dans les zones C_I, il est autorisé d'acidifier ou de désacidifier selon les cas; l'emploi de l'un des procédés exclut naturellement l'emploi de l'autre. L'utilité de la zone intermédiaire a été mise en évidence en 1976 où les conditions de maturation du raisin suivant la latitude ont été bouleversées, et où les grands crus ont présenté une forte acidité.

Acidité, pH et goût acide

Entre ces trois termes n'existe qu'un rapport indirect.

Le pH conditionne directement la conservation du vin. Un pH bas provoque une plus grande résistance aux maladies et le ralentissement des réactions chimiques en particulier celles qui participent au processus de vieillissement. D'autre part, il diminue la stabilité des substances colloïdales du vin se trouvant portées au voisinage de leur point isoélectrique. Enfin, il permet une plus grande efficacité des antiseptiques tels que l'acide sorbique et SO_2.

Le pH dépend lui-même du rapport entre anions et cations et de la nature des acides mais pas directement de la teneur en acide. Cependant, on observe généralement des valeurs basses du pH pour des teneurs élevées en acides; sans doute un rapport indirect existe-t-il entre teneur en acide et pH d'une part, goût acide d'autre part. Mais on ne peut actuellement chiffrer ce goût acide par des valeurs analytiques. On l'apprécie uniquement empiriquement, mais d'une façon différente selon les régions et les années.

Correction de l'acidité et composition en acides

A l'invitation de l'O.I.V., Faber (1970) a étudié ce problème œnologique. Les procédés de correction de l'acidité sont, soit microbiologiques, soit physico-chimiques.

Les procédés microbiologiques permettent d'agir sur l'acide malique et de moindre façon, sur l'acide citrique alors que les procédés physico-chimiques traditionnels ne peuvent agir que sur l'acide tartrique. Il est donc important de connaître non seulement le degré d'acidité mais aussi la nature des acides.

Le moût frais contient environ 90 p. 100 d'acides tartrique et malique. Les proportions respectives de ces deux acides dépendent du climat, de la région et du cépage.

Quand la vendange présente une forte pourriture le moût contient également des teneurs plus élevées en acides uronique, galacturonique, gluconique et citrique. Les acides tartrique et malique peuvent alors former moins de 90 p. 100 de l'acidité de titration. Le moût contient en outre de l'acide pyrrolidine-2 carboxylique, des acides phényl-carboxyliques, des amino-acides, les acides du cycle de Krebs, et des acides formés lors d'autres cycles métaboliques des levures, acides succinique, lactique et acétique.

Procédés de correction de l'acidité

Acidification

Par des processus microbiologiques

On sait depuis longtemps que, outre les sous-produits de la fermentation cités ci-dessus tels que les acides succinique, lactique, acétique, il se forme aussi des acides malique, citrique, citramalique et certains autres acides dont la présence n'a été révélée que depuis quelques années par exemple l'acide hydroxyglutarique et l'acide diméthylglycérique (MOHLER et PIRES 1969; CASTINO, 1969; WURDIG, 1969).

Ce dernier acide est produit en aussi grande quantité que l'acide lactique (0,2 g/l). Selon RADLER (1973) (FUCK et RADLER, 1973), cette formation d'acide peut atteindre 5 à 9 g/l chez certains genres de levures quand la concentration en sucre est élevée. Mais ces genres isolés par RADLER ont une faible capacité fermentative et leur emploi pratique n'est pas encore possible. Cette possibilité d'augmentation de l'acidité des moûts pauvres en acide, mais riches en sucre ne doit pas pour autant être négligée.

Par des méthodes chimiques

— Le procédé le plus utilisé est l'addition d'acide L (+) tartrique naturel. L'acide DL ou racémique étudié récemment ne sert pas à l'acidification mais à la diminution de la teneur en calcium pour éviter la précipitation des sels de calcium dans les bouteilles. Par contre, aucun pays viticole ne permet l'utilisation d'acide DL malique ou L (—) malique naturel car ils ne sont pas stables microbiologiquement. Bien que chimiquement et biologiquement stable et jugé acceptable du point de vue gustatif, l'acide lactique difficile à obtenir pur, est interdit.

— Un deuxième procédé est l'acidification par échangeurs de cations. L'acidité titrable est augmentée par échange des cations potassium, calcium, magnésium contre des ions H^+ ce qui entraîne l'augmentation du rapport anions/cations d'où un fort abaissement du pH. L'augmentation du goût acide est plus forte que ne laisse prévoir l'augmentation de l'acidité titrable. Bien qu'ayant donné de bons résultats expérimentalement, ce procédé n'est pas utilisé, et d'après le réglement C.E.E., l'utilisation des échangeurs d'ions n'est plus permise.

— Rappelons enfin les procédés de plâtrage et de phosphatage, rarement utilisés aujourd'hui. L'effet tampon est diminué et le pH abaissé. Outre l'augmentation du goût acide on obtient une amélioration de la couleur et une meilleure stabilité biologique.

Par des méthodes technologiques

Il s'agit du coupage avec des moûts ou des vins riches en acides. Ceux-ci sont obtenus par le choix des cépages ou par une récolte avancée. Toutefois, ce dernier procédé risque d'entraîner un goût herbacé dans les vins.

Désacidification

Par des processus microbiologiques

Plusieurs processus microbiologiques sont suivis d'une diminution de l'acidité. Ce sont :

La fermentation malolactique :

Lors de la fermentation malolactique l'acide malique est transformé en acide lactique avec dégagement de CO_2.

Dans le vin rouge il peut y avoir des changements de couleur considérable. Le vin devient parfois épais et visqueux après la dégradation de l'acide malique. Il peut y avoir encore des altérations du goût par formation de diacétyle. Pourtant, selon MAYER et VETSCH (1973) ces effets accessoires n'apparaissent que si la fermentation malolactique est provoquée par un coccus : *Pediococcus cerevisiae.* Ces bactéries se développent à pH au moins égal à 3,5. C'est pourquoi, dans le cas de corrections de l'acidité par fermentation malolactique, MAYER recommande d'amener le pH à 3,3-3,4 car à ce pH ne se développent que des bactéries genre *Leuconostoc oenos* qui n'ont pas d'effets accessoires. La correction du pH est possible soit par addition de carbonate de calcium soit par coupage avec des vins riches en acide.

Selon MAYER *et al.* (1976) du SO_2 formé par les levures peut empêcher la fermentation malolactique dès la dose des 50 mg/l. Dans ce cas la désacidification par la fermentation malolactique ne peut être obtenue que par des pratiques particulières : ainsi FLESH (1960, 1961) procède à un chauffage à 20°, addition d'acide ascorbique pour oxyder le SO_2 libre présent et addition d'une culture de bactéries adaptées aux conditions du milieu.

La fermentation de l'acide malique en alcool éthylique par les levures.

La capacité des levures du genre *Schizosaccharomyces pombe* à dégrader de grandes quantités d'acide malique lors de la fermentation alcoolique montrée par KLUYVER (1914) a été le sujet de nombreux travaux scientifiques depuis les années 1960.

RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1962) ont repris ce sujet du point de vue œnologique.

De même que pour la fermentation malolactique, il est impossible de citer ici tous les auteurs ayant étudié ce problème. Qu'il me soit permis pourtant de citer PEYNAUD *et al.*, RANKINE, MAYER *et al.*, MINARIK *et al.*, YANG, DITTRICH, BENDA *et al.*

La dégradation de l'acide malique par les levures du genre *Schizosaccharomyces* présente un grand intérêt pour la correction d'une acidité trop forte car lors de ce processus le produit final est l'éthanol. Il n'y a pas de moyen de désacifidication plus efficace.

Une dégradation de l'acide malique en éthanol a lieu aussi pendant la fermentation par des levures du genre *Saccharomyces*. Selon RADLER (1972) les quantités transformées constituent 20 p. 100 en moyenne de l'acide malique initial. Bien que l'on ait trouvé des genres transformant jusqu'à 40 p. 100, l'utilisation pratique de ces levures n'a pas encore été envisagée.

Par des méthodes chimiques

Contrairement aux procédés microbiologiques, les procédés chimiques de désacidification peuvent être exactement contrôlés et sont calculables excepté les effets de sursaturation partielle. Mais on ne peut pas évaluer la diminution du goût acide liée à la diminution de l'acidité titrable. Il faut se rapporter aux valeurs empiriques, comme cela a déjà été dit. L'avantage du procédé chimique est qu'il ne produit pas d'effet secondaire gênant, contrairement aux processus microbiologiques.

La diminution de l'acidité est obtenue par neutralisation de l'acide en excès. Cependant, cela ne suffit pas, les sels restant dissous dans le vin après neutralisation créant une augmentation importante et néfaste de l'effet tampon et du pH. De plus, l'augmentation de la concentration en cations qui en découle nuit aux caractères gustatifs. La diminution de la concentration en ions hydrogène ne suffit donc pas mais doit s'accompagner d'une diminution équivalente de la concentration en anions. Il y a pour cela deux techniques différentes : l'échange d'ions et la neutralisation avec précipitations des sels peu solubles.

Désacidification par échangeurs d'anions.

On utilise des échangeurs d'anions fortement basiques à groupements OH^-. L'échangeur peut, soit être utilisé en continu, soit être additionné au vin en agitant. Le procédé de mélange ou batch-procédé est préférable pour le traitement de petites quantités. Tous les acides du vin sont concernés (et non seulement un acide particulier). Le résultat dépend de la concentration en acides, de la quantité d'échangeur utilisée, de l'affinité des ions pour l'échangeur variable selon leur rayon et leur charge. Les échangeurs permettent une diminution d'acidité selon la nécessité. Ce procédé est très efficace et son prix de revient tout à fait acceptable si l'échangeur est régénéré.

Pour toutes ces raisons, les échangeurs d'anions ne sont pas utilisés dans les pays viticoles sauf les États-Unis. La question se pose de savoir s'il faut garder cette attitude dans le cas où les échangeurs deviendraient plus stables et moins onéreux.

Un aspect tout à fait nouveau faisant apparaître l'utilisation des échangeurs d'anions sous un jour plus favorable est le fait que la teneur en SO_2 combiné est aussi fortement diminuée par ce procédé, en particulier le SO_2 combiné à l'éthanal. Certaines de nos expériences et celles de WUCHERPFENNIG et MITERBEITERN ont eu pour but de limiter cet effet par utilisation d'échangeurs à anions tartrate ou chargés d'un mélange des anions du vin. Ces expériences sont en cours.

Désacidification par addition de sels de potassium

L'acide tartrique est partiellement neutralisé par transformation en crème de tartre. Simultanément la concentration en potassium augmente. On peut utiliser l'hydroxyde de potassium, le carbonate neutre de potassium ou le tartrate de potassium. Le règlement CEE autorise seulement le tartrate de potassium, bien que WEGER (1957) ait prouvé qu'il n'y a pas non plus de changement défavorable de la composition du vin sous l'action du carbonate neutre de potassium. L'utilisation de l'hydroxyde de potassium est interdite partout.

Précipitation de crème de tartre par refroidissement

La diminution de la teneur en acide tartrique par ce procédé n'a qu'un faible effet sur l'abaissement du goût acide. Il peut même faire que l'acidité soit encore plus perceptible qu'avant par abaissement du tampon.

Désacidification par le carbonate de calcium

Par précipitation de tartrate de calcium

C'est le procédé le plus ancien et le plus utilisé. Il est admis dans tous les pays viticoles où une désacidification peut s'avérer nécessaire.

Par addition de carbonate de calcium les ions H^+ du vin sont neutralisés par combinaison aux ions carbonate et donnent de l'acide carbonique non dissociable dont l'excès est dégagé sous forme de CO_2. Les ions calcium restants réagissent avec les ions tartrate présents pour donner du tartrate de calcium qui, faiblement soluble, précipite. Cependant, cette précipitation n'est pas rapide. Le tartrate de calcium forme des solutions légèrement sursaturés; l'équilibre de solubilité est retardé et il peut s'écouler plusieurs semaines avant que la précipitation soit achevée. Empiriquement, on compte six semaines. Cependant, une attente de trois mois assure plus de sécurité. L'addition d'acide racémique (acide tartrique D. L.) ou de tartrate de calcium D (—) apporte une stabilisation en quelques jours. Comme la désacidification par le tartrate de potassium, la désacidification par le carbonate de calcium est limitée à l'acide tartrique qui au pH du vin forme avec le calcium un sel peu soluble.

Il est à noter qu'une désacidification par du carbonate de calcium est beaucoup plus efficace sur du moût en fermentation avant la précipitation de crème de tartre que sur du vin, car la teneur initiale en potassium est conservée. Un vin dont on a désacidifié le moût a un pH plus élevé et un goût moins acide qu'un vin désacidifié dans les mêmes proportions après fermentation. Éventuellement, un pH plus élevé peut avoir des conséquences défavorables sur la stabilité microbiologique.

Par précipitation du sel double tartrique et malique de calcium

Depuis des années on a cherché des méthodes permettant la diminution chimique de la teneur en acide malique. On a parfois observé (Kielhofer, 1957; Troost, 1958; Klenk, 1955) que lors d'une désacidification par le carbonate de calcium, la diminution de la teneur en acide tartrique était plus faible que celle de l'acidité titrable, ceci surtout quand la quantité de carbonate de calcium calculée n'était ajoutée qu'à une partie du moût ou du vin (v.d. Heide, 1922).

C'est pourquoi on a pensé qu'un peu de malate de calcium précipite avec le tartrate de calcium. Kielhofer (1957) a expliqué cet entraînement du malate de calcium par la formation de sel double : tartrate et malate de calcium. Ordonneau, il y a 80 ans, a observé l'existence de ce sel pour la première fois; Münz (1960, 1961) comprit que sa précipitation permettait une désacidification continue. Mais son procédé (Bohringer et Münz, 1962) était tellement compliqué qu'il n'a jamais été appliqué. Nous avons mis au point avec Kielhofer une technique très pratique qui a trouvé une large utilisation. Depuis sa publication en 1963 (Kielhofer et Wurdig, 1963, 1965) et son autorisation en 1965 en Allemagne Fédérale, ce procédé est connu sous le nom de « Acidex-Entsäuerung » (désacidi-

fication Acidex). Autorisé par le règlement C.E.E. n° 1594/70, Art. 4.2, ce procédé est utilisé aujourd'hui dans d'autres pays que l'Allemagne.

Le sel double formé (WURDIG et KIELHOFER, 1965; WURDIG, 1965, 1977) est un sel neutre de calcium de l'acide malique naturel levogyre et de l'acide tartrique naturel dextrogype dans la proportion 1/1 cristallisant avec 8 molécules d'eau. C'est un racémique formé d'une paire des mêmes molécules mais de configurations opposées. Le sel double $C_4O_6H_4Ca$, $C_4O_5H_4Ca$, 8 H_2O cristallise en longues aiguilles soudées en forme de hérisson ou de touffe.

A cause de l'entraînement inévitable de tartrate de calcium lors de la précipitation du sel double, la proportion de sel double dans le précipité n'atteint que rarement plus de 50 p. 100 correspondant à 3 parties d'acide tartrique pour une partie d'acide malique. Si on réussit à porter le pH à au moins 4,5 sans qu'il y ait élimination de tartrate de calcium ou si l'augmentation de pH a lieu avant l'addition de calcium, tout l'acide tartrique présent cristallise en sel double. Mais, même dans ces conditions, la composition du sel double n'est pas constante. On n'obtient la proportion théorique (une partie acide tartrique, une partie d'acide malique) que si le sel double cristallise lentement. Par contre, lors de précipitation de solutions fortement sursaturées dans des conditions correspondantes à celles de la désacidification du moût et du vin, la composition du sel double varie selon la composition des solutions mères. Ceci s'explique de la manière suivante :

Contrairement aux « vrais » racémiques pour lesquels les produits de solubilité des composants sont supérieurs à celui du racémique, l'un des composants du sel double, le tartrate de calcium précisément, se trouve être moins soluble.

$S^{1/2}$ (sel double) $= (2{,}1 \times 10^{-10})^{1/2} = 1{,}45 \times 10^{-5}$
et
S (tartrate de calcium) $= 7{,}7 \times 10^{-6}$

Ceci signifie que dans les solutions équimoléculaires des composants, les cristaux de sel double ne sont pas stables. En conclusion :

— Le sel double pur ne peut être précipité à partir d'une solution équimoléculaire de tartrate et de malate, qui à cause de la dissociation différente des deux acides n'est pas équivalente à une solution équimoléculaire d'acide tartrique et d'acide malique.

— Il y aura toujours un mélange de sel double et de tartrate de calcium. Une solution contenant de l'acide tartrique et de l'acide malique dans le rapport 3/5 environ, donne un précipité composé d'acide tartrique et d'acide malique dans le rapport 1/1.

— Dans le cas d'un excès encore plus important d'acide malique et surtout pour une acidité titrable encore plus élevée il y a en outre la précipitation de malate de calcium.

— Le rendement du procédé (Rendement = g/l d'acide malique précipité/g/l d'acide tartrique précipité) est amélioré par cet entraînement de malate de calcium.

— Le maximum d'élimination du sel double n'est pas constant, mais se déplace vers les valeurs de pH plus basses, l'acidité totale restant constante et le pourcentage d'acide tartrique diminuant (par exemple, 15 g/l d'acidité totale correspondent à 45 p. 100 d'acide tartrique à pH 4,5 et seulement 15 p. 100 à pH 3,95). Pour obtenir le maximum de précipitation de l'acide malique sous forme de sel double, il est nécessaire d'élever le pH pendant un temps très court et le plus rapidement possible jusqu'à une valeur supérieure au maximum d'élimination. Dans ce procédé Acidex, ceci est réalisé d'une manière très simple : une partie, calculée

d'avance, du vin ou du moût à désacidifier est mélangée à la quantité de carbonate de calcium nécessaire à la désacidification du volume total. Il est nécessaire d'utiliser un carbonate de calcium extrêmement soluble, qui réagisse encore à pH 6 environ et en quelques secondes seulement. De plus, il est bon de mélanger de façon homogène une petite quantité de germes cristallins de sel double. La quantité de carbonate de calcium, la partie de moût ou de vin à traiter peuvent être calculées à partir des formules suivantes :

Pour le moût :

(1) $$v = Vt \times \frac{\Delta A}{A - 2}$$

Pour le vin :

(2) $$V = Vt \times \frac{\Delta A}{A - 3}$$

v = partie du moût ou du vin en l,
V_t = volume total à désacidifier en l,
A = acidité de titration (g/l),
ΔA = diminution d'acidité à obtenir.

(3) Carbonate de Calcium (choix spécial Acidex) $= \frac{2}{3}$ V A g.

En pratique les valeurs sont données par un tableau.

Les calculs sont faits avec (A — 2) g/l (moût) et (A — 3) g/l (vin) pour tenir compte du fait que le maximum de précipitation de sel double se déplace vers des valeurs de pH plus basses lors d'une augmentation de l'excès d'acide malique. Cette correction augmente V et le pH final est déplacé vers la zone acide.

La diminution maximale possible de l'acidité est limitée par l'acide tartrique présent. Elle peut se calculer selon les deux formules suivantes (HAUSHOFER, 1971; REBELEIN, 1970, 1971).

Pour le moût :

(4) $$\Delta A_{max} = \frac{(T - 0{,}5)(M - 2)}{(M - 2) - T}$$

Pour le vin :

(5) $$\Delta A_{max} = \frac{(T - 0{,}5)(M - 3)}{(M - 3) - T}$$

T = acide tartrique.
M = acide malique.

Quand on veut en plus tenir compte de l'entraînement du malate de calcium, on modifie les formules de la façon suivante (WURDIG, 1974) :

Moût :

(6) $$A_{max} = \frac{(T - 0{,}5)(M - 2)}{(M - 2) - kT}$$

Vin :

$$A_{max} = \frac{(T - 05)(M - 3)}{(M - 3) - kT} \quad (7)$$

Si l'acide tartrique représente :

— 35 p. 100 de l'acidité de titration $k = 1{,}2$,
— 25 p. 100 de l'acidité de titration $k = 1{,}3$,
— 15 p. 100 de l'acidité de titration $k = 1{,}4$.

Enfin, pour être complet, il faut noter qu'il est possible de remédier à un taux d'acide tartrique insuffisant pour obtenir la désacidification désirée, par addition de ce même acide.

La désacidification par le sel double devient ainsi un procédé universel que l'on peut utiliser aussi pour les jus de fruits. Dans le cas de jus de fruits contenant de l'acide citrique, une partie de cet acide est précipitée en citrate de calcium, que l'on ne distingue que difficilement du sel double par observation au microscope. Selon une proposition de REBELEIN (1970, 1971) le mieux serait de n'ajouter la quantité nécessaire d'acide tartrique qu'à la fin du processus de désacidification après que l'on ait mélangé la partie traitée.

La quantité d'acide tartrique à ajouter T′ est :

$$T' = \frac{V_t}{2{,}2}\left[A - T + 1 - \frac{1{,}2\,\Delta A - T}{M - 2}\right] g \quad (7)$$

(8) Carbonate de calcium (choix Acidex) $= V_t\,\Delta A + T'$.

Les parties du moût ou du vin à traiter sont calculées selon les formules (1) ou (2).

La mise en pratique de la désacidification Acidex se fait très simplement. On détermine d'abord la quantité de moût à désacidifier et son acidité de titration.

La détermination de la teneur en acide tartrique n'est nécessaire que pour désacidifier du vin, du moût de raisins gelés, et quand l'acidité dépasse 18 g/l. On détermine ensuite la diminution d'acidité désirée et la quantité de carbonate de calcium nécessaire. Dans un récipient ouvert d'un volume double de celui de la partie à traiter, on mélange le carbonate de calcium à 10 p. 100 de la partie calculée. A ce mélange on ajoute, en agitant vivement, le reste de la partie calculée.

Il faut compter 20 à 25 min environ. Quand le dégagement de CO_2 est fini, après — 5 à 10 min (toujours en agitant) le sel double précipité doit être séparé.

Ceci peut être fait en laissant décanter ou en filtrant sous pression sur des tissus filtrants ou sur des filtres de Kieselguhr ou de cellulose.

La partie désacidifiée et limpide est tout de suite mélangée au reste du moût. Après ce mélange, l'excès de calcium est éliminé sous forme de tartrate de calcium par combinaison par l'acide tartrique du moût non désacidifié.

Le tableau I montre les changements de la composition chimique du moût et du vin pendant la désacidification par le sel double. Nous voyons dans la dernière colonne que les vins finis ont une composition tout à fait normale.

D'après les valeurs en acide tartrique et en acidité de titration, on peut faire le calcul suivant :

Lors de la désacidification du moût, 3, 7 g/l d'acide malique et 3,2 g/l d'acide tartrique ont été précipités ensemble avec une petite quantité de malate de calcium et 1,7 g/l d'acide tartrique en tartrate de calcium lors de la reprécipitation du cal-

TABLEAU I

	Désacidification du moût						Désacidification du vin				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Moût avant désacidification	Partie désacidifié de 1	Ensemble des parties 1 et 2	Vin	Vin	Vin	Vin après fermentation de 1	Partie désacidifiée de 7	Ensemble des parties 7 et 8	Vin	Vin
Temps écoulé après la désacidification (en j)	0	0	0	41	90	203	0	0	0	51	164
Alcool (g/l)	—	—	—	79,5	79,5	78,5	77,0	—	—	76,9	78,2
Sucres (g/l)	182	—	181	4,8	4,5	4,8	6,8	—	6,7	6,7	3,5
Extrait (g/l)	213,5	—	206,5	29,1	27,9	27,6	34,9	—	31,3	29,7	26,9
Extrait sans sucre (g/l)	32,5	—	26,5	25,3	24,4	23,8	29,1	—	25,6	24,0	24,3
Acidité totale (g/l)	15,4	2,3	8,1	7,7	7,7	7,6	14,9	2,9	8,3	8,0	8,1
Acide tartrique (g/l)	6,3	0,3	3,1	1,5	1,4	1,4	4,5	0,1	1,9	1,0	1,1
Acide malique (g/l)	8,6	1,8	4,9	4,9	5,2	4,9	7,6	2,3	4,7	4,6	4,6
pH	3,0	4,7	3,4	3,3	3,3	3,2	3,0	4,6	3,8	3,3	3,2
Cendres (mg/l)	2,72	—	3,10	2,60	2,40	2,40	1,80	—	2,60	2,30	2,30
Calcium (mg/l)	74	—	340	125	116	125	125	—	460	213	162
Acide sulfureux libre (mg/l)	—	—	—	15	34	50	51	—	48	26	36
Acide sulfureux total (mg/l)	—	—	—	93	176	208	153	—	187	—	227

Désacidification du moût: 4,83 kg de chaux Acidex et 540 l de moût, pour un volume total de 980 l ont été mélangés en agitant.
Désacidification du vin: 4,68 kg de chaux Acidex et 590 l de vin, pour un volume total de 1 018 l ont été mélangés en agitant.

cium. De la crème de tartre précipite également lors du mélange du volume traité au volume total. Donc pour la précipitation de 1 g/l d'acide malique on a utilisé 1,3 g/l d'acide tartrique.

Lors de la désacidification du vin, 2,9 g/l d'acide malique et 2,6 g/l d'acide tartrique ont précipité en sel double et en malate de calcium, et 0,9 g/l d'acide tartrique en tartrate de calcium lors de la reprécipitation du calcium. Donc, pour la précipitation de 1 g/l d'acide malique on a utilisé 1,2 g/l d'acide tartrique. Quand les quantités d'acide tartrique dans la partie traitée sont plus faibles que dans les cas précédents, la quantité d'acide tartrique nécessaire pour précipiter 1 g/l d'acide malique augmente beaucoup. Il faut aussi remarquer que la couleur de la partie désacidifiée du moût ou du vin peut augmenter à cause de l'augmentation du pH ceci en plus du fait que la quantité de fer augmente dans le moût ou dans le vin.

Après mélange de la partie désacidifiée à la partie non désacidifiée la couleur diminue rapidement et au bout de quelques heures on obtient la couleur initiale. Enfin, on peut encore observer qu'après la désacidification il faut compter autant de temps pour obtenir l'équilibre du tartrate de calcium en solution, que par la désacidification par le carbonate de calcium.

Expérimentalement (KIELHÖFER et WURDIG, 1964) on a constaté que la désacidification par le sel double n'a pas d'inconvénient du point de vue gustatif par rapport à la désacidification normale. Elle a plutôt des avantages car elle apporte une amélioration de l'aspect du moût. Pendant les 10 années au cours desquelles on a utilisé la désacidification par le sel double, on n'a pas constaté que la brève augmentation de pH à des valeurs voisines de 5, apporte des changements néfastes.

Ceci est également valable pour la désacidification du vin.

Bien que des dégustations aient montré que statistiquement la désacidification par le sel double améliore la qualité organoleptique du vin lorsqu'elle est effectuée sur le moût et non sur le vin, les différences qui ne sont pas toujours dans le même sens sont tellement faibles qu'il n'y a pas de raison de déconseiller la désacidification du vin par le sel double là où elle est nécessaire. D'ailleurs on observe des différences du même ordre dans la désacidification classique avec le carbonate de calcium.

Chaque fois que ce sera possible, on préférera la désacidification du moût à celle du vin ne serait-ce que pour la plus grande variété de désacidifications possibles.

Summary

Correction of the must and wine acidity level

Acidification and deacidification are œnological processes of equal importance which aim to modify the acid levels from varying climatic conditions over different years to the consumers appreciation. As opposed to acidification which presents no problems since the addition of acid is the only means available, different ways of de-acidification are possible. Malolactic fermentation which is often considered the more natural of these, is impossible in certain viticultural regions where this bacterial degradation of acid is unobtainable naturally or by seeding. In these cases, calcium carbonate, also otherwise employed, is useful. Qualitatively, perfect results are obtained, since contrary to the biological method of de-acidification, the decrease in acidity can be exactly calculated and secondary effects (colour loss, taste faults, formation of physiologically-active substances for example amines) are not incurred. A refinement of this method,

called " Acidex-Deacidification " corrects acidity levels in natural proportions; during this deacidification tartric acid as well as malic acid are precipitated as a double salt resembling a raceine, composed of one molecule of calcium tartrate, one molecule of calcium malate and eight molecules of water of crystallisation. The use of very pure particle-form calcium carbonate is essential.

Key-words: *Musts — Wines — Conservation acidity — Corrections — Régulations.*

Références bibliographiques

BÖHRINGER P., MÜNZ Th., 1962. *Weinberg u Keller*, **9**, 31.
CASTINO M., 1969. *Riv. Vitic. Enol.*, **22**, 197.
FABER F., 1970. *Bull. O.I.V.*, **43**, 1152.
FLESH P., 1960. *Mitt. Klosterneuburg*, **10**, 1.
FLESH P., 1961. *Mitt. Klosterneuburg*, **11**, 173.
FUCK P., RADLER F., 1972. *Arch Mikrobiol.*, **87**, 149.
HANSHOFER H., 1971. *Mitt. Klosterneuburg, Ser. A. XXI*, 10.
HEIDE C., 1922. *Der Wein*, S 122 Verlag Vierveg, Braunschweig.
KIELHÖFER, 1957. *Weinburg U. Keller*, **4**, 136 et 141.
KIELHOFER E., WURDIG G., 1963. *Dtsch Weinzgt*, **99**, 1022.
KIELHOFER E., WURDIG G., 1964. *Wein Wissenschaft*, **19**, 159.
KLENK E., 1955. *Dtsch Weinbau*, **10**, 696.
KLUYVER A. J., 1914. *Biochen Suikerbepalingen* (Thèse), Delft.
MAYER K., VETSCH U., 1973. *Schweiz Z. Obst- u. Weinbau*, **109**, 635.
MAYER K., VETSCH U., PAUSE G., 1976. *Schweiz Z Obst u. Weinbau*, **112**, 89.
MOHLER K., PIRES R., 1969. *Z. Leubeusm. Unters. u. Forsch.*, **140**, 88.
MÜNZ Th., 1960. *Weinberg u. Keller*, **7**, 239.
MÜNZ Th., 1961. *Weinberg u. Keller*, **8**, 103.
RADLER F., 1972. *Weinberg u. Keller*, **19**, 357.
RADLER F., 1973. *Weinberg u. Keller*, **20**, 239.
RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1962. *C.R. Acad. Agric.*, **48**, 558.
REBELEIN H., 1970. *Weinblatt*, **65**, 283, 718.
REBELEIN H., 1971. *Allg Dtsch Weinfachzeitschr*, **107**, 1208.
TROOST G., 1958. *Dtsch. Weinbau*, **13**, 74.
WEGER B., 1957. *Mitt. Klosterneuburg, Ser. A.*, **7**, 297.
WURDIG G., 1965. *Dtsch Weinbau*, **20**, 967.
WURDIG G., 1969. *Vortras 47*, Deutscher Weinbaukongred in Offenbach.
WURDIG G., 1974. *Allg Dtsch Weinfachzeitschr*, **110**, 1308.
WURDIG G., 1977. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch*, **28**, Waldkircher, Verlagsgesellshagt.
WURDIG G., KIELHOFER E., 1965. *Wein Wisseschaft*, **20**, 341.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 185-187

INTERVENTION

Les facteurs biochimiques de la formation des vins mousseux

S. P. AVAKIANTS

Institut des Industries Alimentaires, Moscou (U.R.S.S.)

Le vin de base

Dans les vins de base nous avons mis en évidence quelques oxydoréductases et hydrolases. Les malate-, glutamate-, alanine-, succinate- et lactate-déshydrogénases prennent part à la réduction des composants du bouquet et du goût. Nous avons trouvé des hydrolases qui catalysent la synthèse des esters éthyliques des acides caproïque, caprylique, lactique et d'autres qui jouent un rôle important vis-à-vis des processus biochimiques de la formation du vin mousseux. Parmi les hydrolases, la β-fructofuranosidase est la plus active, elle catalyse la synthèse du β-fructoside d'éthyle. Les protéines sont hydrolysées par les protéinases et les peptidases; l'activité protéinase est élevée.

La constitution des substances azotées est très variée selon le cépage, la région, l'année, la technologie de la production de vin de base. Nous avons isolé des protéines qui ont la forme de flocons blancs et qui comportent 2 à 3 fractions de poids moléculaires différents. L'alanine, la thréonine, les acides glutamique et aspartique, la glycine et la serine dominent parmi les acides aminés des protéines des vins de base. Les peptides représentent 20 à 70 p. 100 des substances azotées. Nous avons identifié 22 acides aminés parmi lesquels la proline est le plus important (jusqu'à 40 p. 100). Les acides aminés libres représentent 30 p. 100 des substances azotées des vins de base.

Dans les vins nous avons identifié et dosé 76 composants odorants, 37 esters, 13 alcools, 7 terpénoïdes, 9 acides, 10 composés carbonyliques. Nous avons tracé les « aromogrammes » des vins et des vins mousseux. Il y a une différence importante entre la composition des substances volatiles du vin et celle du gaz surmontant le vin. La concentration de l'acétate d'éthyle, de l'isopentanol, de l'isobutanol, de l'acétaldéhyde, des esters éthyliques des acides gras dans les vapeurs émises par des vins de base et du vin mousseux est assez grande. Leur effet sur les

organes de l'odorat est important. Ces composants jouent un rôle principal dans la formation du bouquet des vins mousseux.

Les recherches détaillées des différentes substances influençant le goût, le bouquet et la couleur des vins de base nous ont permis d'établir des critères objectifs pour la qualité des vins de base et des vins mousseux.

Levures

La composition des produits de la champagnisation dépend de l'activité des enzymes qui catalysent les différents processus biologiques dans la cellule de levure. C'est pourquoi l'utilisation des différentes espèces de levure conduit à la production de vins mousseux contenant différents alcools, esters, acides, aldéhydes.

En dehors des enzymes constitutifs les enzymes inductibles se forment dans les levures. Leur synthèse dépend des conditions de multiplication des levures et de la composition du milieu, celui-ci exerce une influence sur la composition chimique des levures. La fixation des conditions optimales de culture des levures est indispensable.

Les composants des levures prennent part aux processus biochimiques et passent dans les vins mousseux pendant l'autolyse des levures. Les études cytophysiologiques et biochimiques de la cellule et du vin nous ont permis de proposer le mécanisme du processus de l'autolyse des levures.

On a trouvé que pendant l'autolyse la cellule de levure excrète dans le vin les peptides-hydrolases, déhydrogénases, 20 acides aminés, esters, terpénoïdes, acides gras et autres composants qui forment les nuances spécifiques du goût et du bouquet. La composition des produits excrétés dépend de l'espèce de levure, de l'état physiologique de la cellule et du régime d'autolyse.

Champagnisation

L'activité des levures et la transformation des composants des vins de base forment les propriétés principales du vin mousseux pendant la champagnisation. Il y a une différence entre les processus biochimiques pendant la champagnisation en bouteille et en cuve close.

Lors de la production des vins mousseux en bouteilles il y a 4 périodes principales au cours desquelles l'intensité et l'orientation des processus biochimiques sont différentes.

1re période (0-7 jours) — reproduction des levures, qui s'accompagne de l'assimilation de l'oxygène et des substances azotées; adsorption des enzymes.

2e période (7-30 jours) — correspondant à la fin de la seconde fermentation; les levures produisent la majorité du CO_2 et d'autres produits de la fermentation. Le potentiel d'oxydo-réduction du vin baisse.

3e période (30-365 jours) — déroulement intensif des processus biochimiques. Après avoir fini la fermentation, les levures commencent à s'autolyser. Les levures excrètent dans le vin des enzymes (déhydrogénases et hydrolases) des peptides, des acides aminés, des substances phosphorées, des terpénoïdes, des lipides, des esters. Les enzymes excrétées augmentent la vitesse des réactions dans le vin.

En même temps, les réactions améliorant la qualité des vins mousseux ont lieu dans le cytoplasme et les organes des cellules de levures.

4e période (2-3 années) — déroulement des processus biochimiques lent. Les levures perdent 1/3 de leurs composants sans être détruites. Les levures détruisent et excrètent des lipides, terpénoïdes, esters et autres composants odorants qui forment le goût du champagne vieux.

Lors de la fermentation en cuve il y a 2 périodes; les troisième et quatrième périodes, les plus importantes du point de vue de formation de la qualité des vins mousseux, sont absentes. Cela explique pourquoi le goût et le bouquet des vins ne sont pas bons.

La méthode de champagnisation continue dans les cuves closes élimine les défauts des méthodes périodiques.

Lors de la champagnisation continue il n'y a pas de première période. La reproduction des levures a lieu dans une installation spéciale. Nous avons trouvé des voies nouvelles pour accélérer les réactions biochimiques après la seconde fermentation en cuve close. Ces procédés reproduisent les processus biochimiques qui ont lieu pendant la champagnisation en bouteille.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 189-200

Acquisitions récentes dans la sélection et l'utilisation des souches de levures pures en œnologie

B. C. RANKINE

The Australian wine Research Institute, Adelaide (Australia)

Résumé

L'utilisation des levures pures sélectionnées, dans les régions chaudes d'Australie, de Californie et d'Afrique du Sud a pris, par suite de sa grande facilité, une importance œnologique considérable. Les préparations servent à préparer un levain à partir de moût, stérilisé ou non, ou sont tout directement ajoutées au jus après réhydratation. On décrit et on discute les principes de sélection et la pratique de l'ensemencement par souche pure; enfin on présente quelques résultats concernant l'influence de l'espèce de levure sur la composition et la qualité des vins.

Mots clés : *Œnologie — Levures sélectionnées — Modes d'utilisation — Rôle qualitatif.*

Introduction

C'est à la suite des travaux de PASTEUR, en 1863, que HANSEN et KUHLE, travaillant à la brasserie CARLSBERG, utilisèrent pour la première fois, en 1884, des souches de levures pures (CURTIS, 1971); ils obtinrent ainsi une double amélioration, maîtrise de la fermentation alcoolique et promotion de la qualité du produit, ce qui conduisit à un emploi systématique de cette technique en brasserie.

Rien ne s'opposant à son utilisation en œnologie, BIOLETTI (1906) en Californie, en publia le mode d'emploi dès 1906; cependant il y a encore seulement vingt ans, l'utilisation des levures pures restait peu répandue. Il existait de nombreuses raisons à cela. D'une part, contrairement au moût de bière stérile, le jus de raisin fraîchement pressé contient un grand nombre de microorganismes; parmi eux on trouve des levures indigènes susceptibles de faire fermenter le moût sans addition

de levures cultivées. D'autre part, au début de l'utilisation en œnologie des levures pures, certains croyaient, complètement à tort, ce levurage indispensable et pensaient que l'addition, à des jus de raisins très ordinaires de levures originaires de crus célèbres leur permettait d'obtenir de très grands vins. Ce n'est que relativement récemment que cette technique, dont les divers aspects ont été passés en revue et discutés par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1960), fut reconsidérée comme susceptible d'agir sur la composition et la qualité des vins (AMERINE, 1974; RANKINE, 1968).

En Australie, en Californie, en Afrique du Sud, on utilise les levures pures de façon courante (DE SOTO, 1955; AMERINE et JOSLYN, 1970; BIDAN, 1975); en Europe (KUNKEE et AMERINE, 1970) malgré la facilité de préparation de telles cultures, leur emploi reste limité puisque l'on constate un début de développement parallèle à celui des levures sèches, efficaces et faciles à utiliser (ANON, 1976). Dans ce travail, nous décrivons et discutons quelques aspects de la pratique courante de cette technique et des développements potentiels de l'étude de cet important secteur de recherches.

Le contrôle de la microflore indésirable des moûts est réalisé par les moyens suivants : addition d'une quantité convenable d'anhydride sulfureux, nettoyage soigné de la vaisselle vinaire et, pour les vins blancs, débourbage du jus; celui-ci reçoit ensuite une souche de levure pure sélectionnée, d'un volume suffisant pour dominer la microflore indigène.

Dans les trois pays précédemment mentionnés, l'importance de l'utilisation de cultures pures est bien reconnue. En Californie KUNKEE et AMERINE (1970) ont souligné son très grand intérêt technologique; combinée avec l'emploi de l'anhydride sulfureux, cette technique permet d'assurer une absence quasi-totale d'accidents de fermentation. En ce qui concerne les jus de raisins blancs, on commence également à réaliser des fermentations contrôlées par addition de levures pures; cette addition se fait après pasteurisation du moût ou après filtration stérile (RANKINE *et al.*, 1976).

Les levures indigènes résistant à l'anhydride sulfureux comme celle du genre *Saccharomyces* sont susceptibles de survivre dans des moûts seulement sulfités mais non stérilisés; ceci n'est pas souhaitable car, fréquemment, le vin acquiert ainsi des caractères désagréables ou reste troublé par des suspensions durables de levures (RANKINE, 1968).

Dans de nombreuses caves australiennes, californiennes ou sud-africaines, qui fournissent chacune de nombreux types de produits différents, l'élaboration des vins se révèle être plus complexe que dans la plupart des caves européennes; d'autre part, la chaleur du climat et la faible acidité des moûts entraînent un développement microbien plus rapide (sauf dans le cas de fermentations à température contrôlée), en particulier pour les levures et les bactéries indésirables qui conduisent à des contaminations et à des baisses de qualité. Ce danger a contribué fortement à préférer l'ensemencement délibéré des moûts au développement spontané de la microflore naturelle et à ses conséquences incertaines.

Comme le fait remarquer RADLER (1973) il n'y a, *a priori*, aucune raison de penser que la microflore naturelle puisse, d'elle-même, entraîner une augmentation de la qualité; l'expérience acquise en pays chauds conduit justement aux conclusions inverses. En France, bien que l'emploi des levures reste encore limité (BIDAN, 1975), il convient de rendre hommage à la contribution majeure apportée sur ce sujet par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD.

Principes de sélection des souches

On sait à présent que les différences entre espèces, et même entre diverses souches du genre *Saccharomyces*, ont des conséquences pratiques. Des souches taxonomiquement identiques ou peu différentes peuvent différer largement dans leurs formations respectives de produits de fermentation, dans leur pouvoir alcoogène et dans la qualité du vin obtenu (PEYNAUD et LAFON, 1952; PEYNAUD, 1957; RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1966; RANKINE, 1968; SAPIS-DOMERCQ, 1970).

Les résultats du tableau 1 provenant d'une expérimentation réalisée à l'Institut Australien de Recherches Œnologiques, mettent en évidence ces différences. Les œnologues qui, dans la pratique, ont dégusté à plusieurs reprises des vins issus de diverses fermentations pures, ont noté de grandes variations de qualité.

D'autres résultats (tabl. 2) montrent les différences qui existent dans les teneurs en alcools supérieurs formés par les diverses souches de levures au cours de la fermentation alcoolique de moûts de trois cépages. Dans ces essais, il est important de procéder à des répétitions pour pouvoir soumettre les résultats à une étude statistique.

Beaucoup de différences offrent un intérêt scientifique mais pas nécessairement pratique; celles qui nous intéressent sont celles, variables selon les circonstances et les pays d'origine, qui ont une signification pour l'œnologue vis-à-vis de la qualité du vin.

En Australie (RANKINE *et al.*, 1976), les critères de sélection retenus pour choisir les souches pures de levures sont la qualité finale du vin, un départ, un déroulement et un achèvement rapides de la fermentation alcoolique (qui ne doit pas déboucher sur des caractères indésirables, tel que celui de la production d'hydrogène sulfuré); ce dernier point, dans le passé, a été à l'origine de nombreux accidents œnologiques; il est en relation étroite avec la levure; l'utilisation de souches pures faibles génératrices de H_2S (et convenables à tous autres points de vue) a beaucoup fait pour la prévention de ce phénomène (RANKINE, 1963, 1964).

Dans le tableau 1, les teneurs en H_2S, entraîné au cours de la fermentation alcoolique par le CO_2, sont exprimées par l'épaisseur en mm du précipité d'acétate de plomb dans le tube de réaction (RANKINE, 1964). On constate que dans les vins issus d'une fermentation par la souche 318, originaire de Bordeaux, les dégustateurs ont noté la présence d'hydrogène sulfuré; cependant, malgré le caractère indésirable conféré au vin, celui-ci a été jugé particulièrement plein et rond en bouche avec un arôme d'esters développé.

La formation de SO_2 pendant la fermentation alcoolique fait l'objet de nombreuses études; elle est en relation avec la souche de levure et peut atteindre jusqu'à 200 mg/l (WÜRDIG et SCHLOTTER, 1968; MINARIK, 1972); les exigences médicales en ce qui concerne la diminution des doses d'anhydride sulfureux utilisées dans le vin soulignent l'importance accordée au choix de souches de levures faibles productrices de sulfites. De même, les vins destinés à la distillation ne doivent contenir que de faibles teneurs en SO_2, de façon à éviter à la fois la corrosion des colonnes de distillation et la présence de goûts étrangers; à cet effet, il est possible de choisir une souche particulière pour les vins destinés à la distillation, pratique courante dans beaucoup de caves australiennes.

Les levures diffèrent considérablement entre elles par leur métabolisme des acides organiques au cours de la fermentation; ceci peut avoir des conséquences sur la composition et la qualité du vin obtenu (WHITING, 1976). C'est en particulier

TABLEAU I

Influence de l'espèce de levure sur le classement à la dégustation et sur la composition sommaire des vins (le moût subit initialement une filtration stérile et un sulfitage à la dose de 30 mg /l; la température de fermentation est de 15°C

Souche de levure ayant assuré la fermentation alcoolique du moût	Numéro de la souche	Note attribuée au vin (sur 20)	Durée de fermentation (jours)	Sucres résiduels (g /l)	Teneur en H^2S (*)	Teneur en sulfites (mg /l)
Sacch. fructuum	138	11,4	41	9	0,8	4
Sacch. veronae	318	12,0	7,7	1	14	23
Sacch. cerevisiae	350	14,8	22	1	0	14
Sacch. cerevisiae	702	12,1	36	3	10	11
Sacch. bayanus	723	13,6	16	1	0,8	42
Sacch. cerevisiae	729	12,0	12	1	5,8	48
Sacch. sp.	741	9,6	16	3	0	105
Sacch. sp.	785	9,4	12	10	4,5	85
Sacch. cerevisiae	786	12,1	8,5	1	11	31
Sacch. sp.	796	13,1	16	1	0,4	12
L.S.D. (P = 0,05)		2,4	2,6	—	2,6	7

(*) La teneur en H_2S est exprimée par le temps (mn) mis par le précipité d'acétate de plomb pour noicir à l'intérieur du tube de réaction.

TABLEAU 2

Influence de l'espèce de levure sur la composition des vins de trois cépages différents et alcools supérieurs (les chiffres représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de deux essais successifs)

Espèce de levure	N° de la souche	Pedro Ximenes (pH du moût 3,33)		Alcools isoamyliques	Muscadelle (pH du moût 3,34)			Ugni Blanc (pH du moût 3,42)			*n*-propanol	isobutanol	Alcools amyliques
		n-propanol	isobutanol		*n*-propanol	isobutanol	Alcools isoamyliques	*n*-propanol	isobutanol	Alcools isoamyliques			
Sacch. fructuum . . .	138	20	11	140	107	9	142	52	8	145	60	9	142
Sacch. cerevisiae . . .	213	16	23	95	41	14	126	21	15	125	26	17	115
Sacch. chevalieri . . .	317	12	39	207	26	30	256	10	34	280	16	34	248
Sacch. cerevisiae . . .	350	56	21	151	170	9	151	92	9	164	106	13	155
Sacch. bayanus . . .	723	18	12	111	38	10	128	16	11	146	24	11	128
Sacch. cerevisiae . . .	727	13	41	259	25	38	270	14	31	257	17	37	262
Sacch. cerevisiae . . .	729	13	22	171	24	18	216	18	15	173	18	18	187
Sacch. carlsbergensis . .	731	9	30	166	19	35	249	11	26	195	13	30	203
Moyenne		20	25	163	56	20	192	29	19	186	35	21	180

L.S.D. (P 0,05)	Moyenne des essais	Moyenne des cépages	Moyenne des souches de levures
n-propanol	22	12	24
Iso-butanol	7	5	9
Alcools amyliques	46	25	50

le cas des acides pyruvique et α-cétoglutarique formés (et, à un moindre égard, de nombreux autres acides cétoniques) qui, en combinant le SO_2, diminuent la teneur en anhydride sulfureux libre efficace (RANKINE, 1968). La formation d'autres acides comme les acides D et L lactiques, succinique, citrique, etc... est également en relation avec le type de levure, de même que le taux d'acide malique catabolisé (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1962); dans des conditions de basse température il peut se révéler intéressant de sélectionner les *Saccharomyces*, ou les *Schizosaccharomyces* qui dégradent l'acide malique; inversement, dans les pays chauds, pour avoir des vins de pH faible, la sélection se fera en fonction de l'aptitude à former de fortes teneurs en acides non volatils. Certaines souches comme *Sacch. bayanus* (*Sacch. oviformis*) sont connues comme ayant un bon rendement en alcool dont elles forment de fortes concentrations, PEYNAUD et DOMERCQ, (1959) ont conseillé l'utilisation de cette espèce pour obtenir d'excellents vins dont l'arôme rappelle celui de la pierre-à-fusil. En Australie, cette espèce est responsable des contaminations des vins de dessert de type Xérès; là où l'on élabore simultanément des vins de table et des vins de dessert on la considère comme particulièrement dangereuse; exception faite d'emplois spécifiques — tels que la reprise d'une fermentation arrêtée — pour lesquels on connaît bien les avantages et les inconvénients, l'emploi de cette espèce est à déconseiller.

La formation d'acide acétique et d'acétate d'éthyle peut également dépendre étroitement de la souche de levure, malgré une aptitude limitée des *Saccharomyces* à former ces substances; des contaminations par *Pichia, Hansenula ou Kloeckera* peuvent cependant provoquer de telles augmentations que le vin en devient inacceptable (PEYNAUD, 1956).

La présence de mousse, au cours de la fermentation, est également en relation partielle avec l'espèce de levure et peut constituer un critère de choix (ESCHENBRUCH et RASSEL, 1975; DITTRICH et WENZEL, 1976); ce n'est pas le cas en Australie où la mousse ne constitue pas un problème de fermentation; elle peut cependant se révéler une contrainte économique en ce sens qu'elle diminue le volume utile des cuves; dans ce cas, l'utilisation d'une souche sélectionnée s'impose.

Les exigences particulières de la fermentation en bouteilles, pour les vins mousseux, entraînent la nécessité d'utiliser des souches sélectionnées en fonction de divers critères : aptitude à la floculation, aptitude à l'atténuation, formation d'arômes agréables (GEOFFROY et PERIN, 1970); il est intéressant de noter que les espèces sélectionnées pour assurer la fermentation secondaire sont actuellement disponibles sous forme sèche.

Comme on le voit, l'emploi de levures sélectionnées se révèle d'une grande souplesse; il est donc tout à fait possible d'envisager de faire correspondre une espèce particulière à chaque utilisation spécifique; à ce titre, nous avons vu qu'il était possible de choisir la souche adéquate en fonction de la destination du vin, consommation directe ou distillation. Aujourd'hui, la plupart des caves australiennes n'utilisent, par commodité, qu'une seule espèce de levure pour assurer la fermentation alcoolique; quelques-unes se lancent dans divers essais d'utilisation de deux souches; des cultures mixtes ont été proposées mais les travaux sur ce sujet restent insuffisants; le maintien, en mélange, de proportions fixes pour chaque espèce présente des difficultés incomplètement résolues, en particulier à cause des phénomènes de dominance.

Le problème de l'utilisation des levures pures sélectionnées se pose non seulement en œnologie mais également en cidrerie où les conditions sont peu différentes; il convient de noter en ce domaine l'importante contribution de BECCH et DAVENPORT (1970).

Entretien et distribution des levures

Les levures sont maintenues à l'état de cultures pour diminuer au maximum les risques de modifications de la souche; en effet, on a montré que les repiquages habituels induisent des modifications diverses; celles qui concernent l'aptitude à former H_2S et SO_2 ont été étudiées, au cours de fermentations réalisées au moyen de divers repiquages d'une même souche de *Saccharomyces cerevisiae* (n° 729, tabl. 3); les cultures ont été envoyées en Californie et en Grande-Bretagne et des repiquages y ont été également réalisés et testés par rapport à la souche d'origine;

TABLEAU 3

Influence du repiquage sur l'aptitude d'une souche de Sacch. cerevisiae *à former H_2S et SO_2*

Repiquage	Teneur du vin en H_2S (*)	Teneur du vin en SO_2 (mg/l)
A	5,5	84
B	2,7	82
C	5,0	84
D	0,5	96
E	6,7	85
L.S.D. (P = 0,05)	1,6	5

(*) La teneur du vin en H_2S est exprimée par le temps (mn) mis par le précipité d'acétate de plomb pour noicir à l'intérieur du tube de réaction.

à la suite de ces divers essais on a enregistré des différences significatives pour les deux aptitudes étudiées; pour d'autres paramètres, il n'y a pas eu de différences.

On a montré que pour avoir une bonne conservation des caractères des souches, la lyophilisation constitue une très bonne technique (Kirsop, 1974); actuellement, dans notre Institut, nous nous préparons à lyophiliser la totalité de notre collection de levures. Cependant, pour des raisons de commodité, on continue à fournir aux caves des cultures liquides sur mélange de moût et d'agar, dans des bouteilles de 30 ml bouchées à vis et accompagnées du mode d'emploi.

Quelques fournisseurs offrent des levures sous forme liquide, prêtes à l'emploi; si cela est pratique, de telles préparations gardent cependant une durée de vie limitée.

Utilisation pratique des souches de levures pures

La mise en évidence de l'existence d'une relation entre la composition et la qualité des vins et l'utilisation de diverses souches de levures constitue le premier stade du choix et de l'utilisation de cette technique; viendra ensuite le stade de l'application au niveau de la cave expérimentale puis enfin celui de l'essai en grand

pour tester l'efficacité du procédé dans les conditions de la pratique. La culture utilisée peut être, soit préparée classiquement, soit provenir de levures pressées ou sèches.

Les conditions utilisées en Australie, ainsi qu'en Californie et en Afrique du Sud, dont nous parlerons brièvement, sont les suivantes :

Utilisation de fermenteurs

Beaucoup de caves, en Australie, utilisent des fermenteurs. Différentes techniques ont été étudiées ces dernières années; le protocole retenu (RANKINE *et al.*, 1976) est le suivant :

Le jus de raisin blanc, foulé, égoutté, pressé et débourbé, est stérilisé, soit par la chaleur (30 mn à 70 °C ou une durée plus courte à température plus élevée), soit à froid par filtration; bien que le procédé par la chaleur soit le plus courant, le dernier reste le meilleur.

Le fermenteur-type est constitué d'une ou deux cuves en acier inoxydable (type 316) intégrant à la fois les dispositifs de stérilisation du moût et ceux d'introduction des levures. Le volume de l'installation est fonction du volume quotidien des apports de vendange; on emploie généralement des récipients d'au moins 100 hl. L'appareillage de stérilisation comprend un agitateur et un dispositif de chauffage (électrique ou à la vapeur) régulé; il doit également y avoir un dispositif de refroidissement, soit par serpentin intérieur, soit par ruissellement extérieur d'eau réfrigérée.

Après stérilisation et refroidissement, le moût est envoyé, généralement par gravité, dans une cuve de multiplication où l'on injecte l'inoculum de levure pure; celui-ci est préparé à partir d'une culture sur milieu solide incliné d'agar puis cultivé sur moût stérile dont on augmente progressivement le volume (de 10 à 20 fois chaque fois). On laisse la souche se multiplier pendant un ou deux jours; à mesure qu'on retire des cultures pour en faire usage on les remplace par du jus refroidi et stérilisé. Environ 10 p. 100 des cultures en fermentation sont conservées afin d'inoculer le jus ajouté, les cultures étant ainsi maintenues en croissance logarithmique. On peut, en outre, aérer le milieu pour augmenter le nombre de cellules.

La « stérilisation » du jus par sulfitage est à déconseiller bien qu'on l'utilise parfois. Certainse levures indigènes résistantes à l'anhydride sulfureux restent susceptibles de se développer aux dépens de la souche pure sélectionnée et provoquer ainsi, comme on l'a déjà vu, une diminution de la qualité du vin (RANKINE, 1968).

L'expérimentation de divers procédés de culture se poursuit actuellement, en particulier celle d'un appareillage allemand de multiplication continue qui offre d'intéressantes possibilités (KLEMM, 1975). La préparation d'un levain de levures sélectionnées en fermenteur reste un travail considérable et coûteux; aussi, tant pour des raisons pratiques qu'économiques, il est hautement souhaitable d'automatiser cette opération.

Utilisation des levures pressées et des levures sèches

L'emploi, en œnologie, de levures pressées et de levures sèches est une conséquence de la production de levures de boulangerie, réalisée en aérobiose intense et dans des conditions de métabolisme glucidique limites (CASTOR, 1953; SALLER et STEFANI, 1962; THOUKIS *et al.*, 1963; GORTGES, 1976).

On utilise divers types de préparations parmi lesquelles les levures congelées, en mélange avec du kieselghur (ADAMS, 1953, 1962, 1966). Ces levures congelées et pressées doivent être conservées au froid; pour les levures sèches cela n'est pas indispensable. D'après PEYNAUD et DOMERCQ (1959), les levures lyophilisées sont utilisées en France depuis 1959; cependant en Australie, on ne peut encore s'en procurer aujourd'hui.

La levure pressée contenant 30 p. 100 d'eau se révèle plus viable (multiplication plus facile) et plus active (fermentation alcoolique plus rapide) que les levures sèches contenant seulement 6 à 8 p. 100 d'eau (REED, 1974); on peut induire la résistance à l'anhydride sulfureux par addition de sulfate au milieu de développement.

Les préparations australiennes de levures pressées, introduites en 1964, que nous avons étudiées sont d'une haute viabilité et d'une bonne efficacité œnologique par suite de leur forte activité. En Californie, on a obtenu des résultats identiques (THOUKIS, *et al.*, 1963). Dans deux cas, cependant, les levures sèches se sont révélées supérieures par suite de leur plus longue durée de vie et de leur facilité de conservation n'exigeant pas de réfrigération.

L'utilisation des levures sèches connaît une popularité considérable bien que la production locale reste souvent de viabilité faible. D'après les fabricants, ceci semble dû, au moins en partie, à la souche elle-même qui a une croissance lente et qui souffre du procédé de dessiccation utilisé pour les levures de boulangerie; ces difficultés font actuellement l'objet de recherches.

Nos résultats concernant la viabilité de diverses préparations de levures sèches (tabl. 4) sont en accord avec ceux obtenus à Bordeaux (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1976). WEGER (1976) présente également les résultats favo-

TABLEAU 4

Comparaison de la viabilité de quelques préparations de levures sèches

Type du vin	Nombre total de cellules /g	Nombre de cellules viables /g	Pourcentage de viabilité des cellules
	$5{,}5 \times 10^{6}$	$4{,}7 \times 10^{10}$	0,01
	$3{,}3 \times 10^{8}$	$7{,}8 \times 10^{10}$	0,4
	$9{,}4 \times 10^{9}$	$8{,}3 \times 10^{10}$	11
	$2{,}5 \times 10^{10}$	$6{,}5 \times 10^{10}$	38
	$1{,}9 \times 10^{10}$	$2{,}3 \times 10^{10}$	83
	10×10^{10}	$2{,}4 \times 10^{11}$	4
Vin tranquille	$5{,}0 \times 10^{9}$	$9{,}2 \times 10^{10}$	5
	$2{,}0 \times 10^{10}$	$5{,}0 \times 10^{10}$	40
	$3{,}6 \times 10^{10}$	$5{,}5 \times 10^{10}$	65
	$1{,}0 \times 10^{10}$	$6{,}2 \times 10^{10}$	16
	$1{,}4 \times 10^{10}$	$1{,}8 \times 10^{11}$	8
	$1{,}1 \times 10^{10}$	$3{,}7 \times 10^{10}$	30
	$6{,}8 \times 10^{9}$	$8{,}2 \times 10^{10}$	8
	$6{,}3 \times 10^{9}$	$1{,}4 \times 10^{10}$	45
Vin mousseux	$1{,}7 \times 10^{9}$	$6{,}7 \times 10^{10}$	3
Xérès	$9{,}8 \times 10^{9}$	$6{,}9 \times 10^{10}$	14

rables d'essais réalisés en Autriche à partir de préparations sèches de *Sacch. bayanus* (*Sacch. oviformis*) sans cependant donner de précisions sur la viabilité des cellules.

La technique de préparation des levures sèches a une influence à la fois sur leur variabilité et sur leur activité; les cultures lyophilisées, par exemple, ont besoin d'une période de rajeunissement plus longue que les levures séchées à l'air chaud (CLÉMENT et JANSSENS, 1976); cela peut provoquer, dans le moût, une dominance des levures indigènes, entraînant elle-même la formation de H_2S ou d'autres caractères indésirables.

L'étude de quelques préparations de levures sèches montre, à la vue de morphologies différentes sur moût-agar et sur extrait de malt-gélatine, qu'on est en présence d'un mélange d'espèces; de tels accidents sont difficiles à éviter lorsqu'on fait pousser la culture d'origine dans des appareillages utilisés également pour la levure de boulangerie. Étant donné que la pureté de la souche est d'une importance majeure, il importe de diminuer au maximum les contaminations.

Les préparations étrangères de levures pures commencent à être disponibles en Australie et on peut prévoir le développement de leur emploi.

Le mode d'emploi des levures sèches est important si l'on désire obtenir une efficacité maximale de l'ensemencement. Une addition directe au moût a souvent pour conséquence la chute au fond de la cuve d'une grande partie des cellules. Les fabricants conseillent une réhydratation au moyen de moût stérile pour faciliter la multiplication et la fermentation. La présence dans l'inoculum, d'un nombre suffisant de levures actives est indispensable pour une utilisation efficace de la préparation.

Dans la plupart des caves de Californie on emploie aujourd'hui des préparations de levures sèches; il s'agit, soit de la souche « *Montrachet* » (U.C.D. Enology 522), soit de la souche « *Champagne* » (Institut Pasteur de Paris); l'addition est faite, en général, à du moût chaud, stérilisé ou non, qui sert ensuite de levain à la concentration d'environ 10^8 cellules par ml. Certaines caves utilisent pour cela des installations particulières de multiplication; dans les cas où, initialement, on ne stérilise pas le moût, on utilise des volumes de réensemencements massifs.

En Afrique du Sud, malgré le développement de l'emploi de levures sélectionnées, l'introduction de levures sèches reste récente; en 1976, quatre souches y étaient disponibles et ont été utilisées à grande échelle : *Epernay, 228* (levure d'origine danoise) *Montrachet* et *Hefix 1000*. Les cultures proviennent à la fois de l'Institut de Recherches sur la Vigne et le Vin et d'importantes firmes œnologiques; actuellement, l'emploi des levures sèches se développe considérablement et continuera à le faire dans le futur.

Doses d'ensemencement

La meilleure évaluation de la dose de levain à ajouter consiste à déterminer le nombre de cellules viables par millilitre de moût.

En Australie, dans le cas des moûts habituels, non débourbés, on conseille généralement une addition de 5×10^6 cellules par ml pour les jus blancs et 10×10^6 cellules par ml pour les jus rouges (RANKINE et LLOYD, 1963); pour les moûts préalablement stérilisés (par filtration ou par chauffage) l'inoculum est moins important. Les cultures en fermenteurs permettent d'obtenir des populations comprises entre 80 et 150×10^6 cellules par ml; on peut atteindre le double au moyen de l'aération; celle-ci, cependant, n'est guère utilisée étant données les

contraintes inhérentes à l'injection continue d'air stérile; si l'on aère brutalement le jus en fermentation dans la cuve de multiplication celui-ci peut se mettre à mousser si violemment qu'il déborde par le barbotteur. Le but recherché, en aérant le milieu, consiste à obtenir une population maximale dans un levain de volume minimum. Pour réaliser un ensemencement convenable des moûts blancs 100×10^6 cellules par ml nous semble une valeur recommandable pour assurer l'efficacité d'une addition au taux de 5 p. 100 d'inoculum en volume; dans le cas des moûts rouges, ce taux doit atteindre 10 p. 100, ce qui est largement suffisant et légèrement supérieur à ce qui se fait en Australie.

Remerciements

L'auteur remercie M. A. V. Hood, the Australian Wine Research Institute pour ses résultats des tableaux 1, 3, et 4 ainsi que ses collègues de Californie et d'Afrique du Sud sur la technique d'ensemencement.

Summary

Progress in the selection and use of pure yeasts in Oenology

The use of selected pure yeast cultures is now an essential part of winemaking in the warm areas of Australia, California and South Africa. The yeasts are basically used in one of two ways — preparation of a pure yeast starter culture in sterilised grape juice in equipment designed for the purpose, or addition of rehydrated dried wine yeast to the must. Sometimes a compromise and less desirable procedure is employed, in which an inoculated but non-sterilised must is used as a starter culture from one tank to another.

Both basic procedures are now used in the countries mentioned and it is likely that, due to simplicity of the operation, the use of dried wine yeast will increase. It is at present most widely used in California. The principles of yeast selection and practices of pure yeast inoculation are described and discussed, and examples of differences in wine quality and composition resulting from the use of differing yeasts are presented.

Key-words: *Oenology — Selected yeasts — Use methods — Qualitative role.*

Références bibliographiques

Adams A. M., 1953. Studies on the storage of yeasts II — Wine yeast starter stored as moist cakes, *Rept. Ont. Hort. Exp. Stn. and Proc. Lab.*, 98-101.

Adams A. M., 1962. The use of stored frozen yeast starter in wine production, *Devel. in Indust. Microbiol.*, **3**, 341-346, Plenum éd. N. Y.

Adams A. M., 1966. Studies on the storage of yeats III — Effect of low temperature on viability of stored starter, *Rept. Ont. Hort. Exp. Stn. and Proc. Lab.*, 114-117.

Amerine M. A., 1974. Les levains en œnologie, *Vignes et Vins, n° spécial*, 46-52.

Amerine M., A. Joslyn M. A., 1970. *Table wines — The technology of their production*, Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, 2e éd., 340-344.

Anon, 1976. Mikrobiologische und technische Aspekte bei der Anwendung von Reinzuchthefen, *Schw. Zeit. Obst. Weinbau*, **112** (22), 549.

Beech F., W. Davenport R. R., 1970. The role of yeasts in cider making *in The Yeasts*, vol. 3, 73-146, Academic Press, London and N. Y.

Bidan P., 1975. Select yeasts. Advantages and disadvantages of the yeasts used in winemaking, *C. R. 4e Symposium Intern. Œnologie*, Valence (Espagne), 213-226.

Bioletti F. T., 1906. Pure yeast in wineries, Circular 23, *Univ. Cali., Agric. Exper. Station.*

Castor J. G. B., 1953. Experimental development of compressed yeasts as fermentation starters, *Wines and Vines*, **34** (8), 27-29 ;**34** (9), 33-34.

Clement P., Janssens G., 1976. Levures sèches actives, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **69**, 325-326.

Curtis N. S., 1971. A century of yeast culture, *Brewers Guardian*, 95-100.

De Soto R., 1955. Ingreting yeast propagation with winery operation, *Amer. J. Enol. Vitic.*, **6**, 26-29.

Dittrich H. H., Wenzel K., 1966. Die Abbängigkeit der Schaumbildung bei der Gärung von der Hefe und von der Most-Behandlung, *Wein-Wissenschaft*, **31**, 263-274.

Eschenbruch R., Rassel J. N., 1975. The development of non-foaming yeast strains of winemaking, *Vitis*, **14**, 43-47.

Geoffroy P., Perin J., 1970. Compte rendu des essais entrepris sur des souches pures de levures champenoises, *Le Vigneron Champenois*, **91**, 131-144.

Görtges S., 1976. Erfahrungen bei der Anwendung von Trocken Reinzuchthefen zur Vergärung von Traubenmost, *Der Deutsche Weinbau*, **26**, 1051-1056.

Kirsop B., 1974. The stability of biochemical, morphological and brewing properties of yeast cultures maintained by subsculturing and freeze drying, *J. Inst. Brew.*, **80**, 565-570.

Klemm K., 1975. Continuous propagation and selection of wine yeasts for fermentation in bulk containers, *C. R. 4e Symposium Intern. Œnologie*, Valence (Espagne), 229-232.

Kunkee R. E., Amerine M. A., 1970. Yeasts in winemaking, *in The Yeasts*, Vol. 3, 5-71, Academic Press, London and N. Y.

Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P., 1976. Premières observations sur l'utilisation des levures sèches en vinification en blanc, *Conn. Vigne Vin*, **10** (3), 277-296.

Minarik E., 1972. SO_2-Bildung durch Sulfatreduktion bei verschiedeven Hefearten der Gattung *Saccharomyces*, *Mitt. Klosterneuburg*, **22**, 245-252.

Peynaud E., 1956. Sur la formation d'acétate d'éthyle par les levures de vin, *Ind. Agric. Alim.*, **73**, 253-257.

Peynaud E., 1957. Charakterisierung der verschiedenen Spezies von Weinhefe, *Mitt. Klosterneuburg*, **7**, 1-15.

Peynaud E., Domercq S., 1959. A review of microbiological problems of winemaking in France, *Amer. J. Enol. Vitic.*, **10**, 69-77.

Peynaud E., Lafon M., 1952. Bilan des produits secondaires de la fermentation alcoolique pour divers genres de levures et dans des conditions différentes d'aération, *Ind. Agric. Alim.*, **69**, 387-408.

Radler F., 1973. Bedeutung und Moglichkeitung der Verwendung von Reinkulturen von Hefen bei der Weinbereitung, *Weinberg und Keller*, **20**, 339-350.

Rankine B. C., 1963. Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines, *J. Sci. Fd Agric.*, **14**, 79-91.

Rankine B. C., 1964. Hydrogen sulphide production by yeasts, *J. Sci. Fd Agric.*, **15**, 872-877.

Rankine B. C., 1968. The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines, *Vitis*, **7**, 22-49.

Rankine B. C., Beckwith A. R., Brown J. G., Day R. E., Tummel M., 1976. Practical use of pure yeast generators in winemaking, *Aust. Grapegrower and Winemaker*, **148**, 48-54.

Rankine B. C., Lloyd B. 1963. Quantitative assessment of dominance of added yeast in wine fermentations, *J. Sci. Fd Agric.*, **14**, 793-798.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1960. *Traité d'Œnologie*, Vol. I, 507-521, Libr. Polytechnique Ch. Béranger, Paris.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1962. Application à la vinification de levures métabolisant l'acide malique, *C. R. Acad. Agric. France*, **48**, 558-560.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1966. Alimentation des levures et produits de leur métabolisme, *Ann. Nut. Alim.*, **20**, 1-23.

Reed G., 1974. Comparison of the use of commercial yeasts, *Process Biochem.*, **11**, 12 et 32.

Saller W., de Stefani C., 1962. Untersuchungen uber de Brauchbarkeit von Presshefe zur Umgärung von Wein, *Mitt. Klosterneuburg, Series A*, **12**, 11-18.

Sapis-Domercq S., 1970. Nouvelles études de la microflore en vinification, *Conn. Vigne Vin*, **4**, 45-61.

Thoukis G., Reed G., Bouthilet R. J., 1963. Production and use of compressed yeast for winery fermentation, *Amer. J. Enol. Vitic.*, **14**, 148-154.

Weger B., 1976. Versuche zur Verwendung von Trockenhefen und neuen pectolytischen Enzymen, *Wein-Wissenschaft*, **31**, 197-201.

Whiting C. G., 1976. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages —a review, *J. Inst. Brew.*, **82**, 84-92.

Würding G., Schlotter J. A., 1968. SO_2-Bildung durch Sulfatreduktion während der Gärung, *Wein Wissenschadt*, **23**, 356-371.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 201-202

INTERVENTION

Observations concernant l'incidence des levures sèches sur la qualité des vins

Mme S. SIKOVEC

Université de Ljubjana (Yougoslavie)

Depuis quelques années on parle de l'emploi du levain sec de souche pure. C'est à ce sujet que j'aimerais vous faire part de nos expériences.

Dans la région viticole de Ljutomer-Ormŏz en Slovénie, nous possédons deux caves dont l'équipement est moderne. Les raisins qu'elles reçoivent proviennent de cette même région viticole; une seule différence : l'une des deux utilise déjà depuis de nombreuses années des levures autochtones sélectionnées dans nos laboratoires. Au début nous n'examinions les résultats que lorsque des souches de levures sélectionnées avaient été utilisées à une température de 5 °C. Par comparaison aux échantillons de vins fermentant spontanément, les résultats qualitatifs étaient meilleurs du point de vue du bouquet. Mais si ces vins avaient un bouquet extraordinaire, ils étaient plus pauvres au palais. A l'analyse nous avons constaté que cela tenait à leur faible teneur en glycérol. La même année nous n'avons pas utilisé une seule souche de levures pures, mais la population de plusieurs souches pour constater que nous obtenions alors une qualité optimale à une température de fermentation de 15 à 18 °C.

De nos expériences nous pouvons conclure que :

— Pour l'élaboration de vins de qualité d'appellation d'origine, seules sont utilisables les levures autochtones de souche pure, parce que les caractéristiques organoleptiques du vin dépendent du climat et de l'écologie.

— Seule la population de levures autochtones de souche pure donne au vin une finesse parfaitement harmonieuse, caractéristique d'une provenance et une perfection du bouquet et de l'arôme.

Nous supposons que le levain sec — qui n'est pas sélectionné tout particulièsement dans une région viticole précise — peut améliorer la qualité de vins de conrommation courante dépourvus des caractères de leur provenance. Son utilisation pour la fermentation de moûts provenant de régions viticoles médiocres constitue

toutefois un grand progrès pour la technologie de ces vins de consommation courante; par contre, il risque de donner un vin neutre c'est-à-dire qu'un vin provenant d'une région viticole de qualité perdra en finesse du bouquet et de l'arôme.

L'utilisation de levain sec dans la pratique courante rendra nécessaire la modification de la législation. C'est pourquoi il est nécessaire de souligner la distinction entre :

— l'élaboration du vin de consommation courante qui ne prétend pas à une caractéristique d'origine géographique, où il serait permis d'utiliser des levures sélectionnées,

— l'élaboration de vins d'appellation d'origine où l'emploi de levures de souche pure autochtone serait seul autorisé.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 203-213

Les activateurs du développement anaérobie de la levure

F. RADLER

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg, Universität Mainz (Bundesrepublik Deustchland)

Résumé

Il est bien connu que les levures, organismes eucaryotiques, ont besoin de l'oxygène moléculaire, qui ne peut pas être remplacé par d'autres accepteurs d'électron.L'oxygène moléculaire est nécessaire pour la synthèse des acides gras non saturés à partir d'acides gras saturés, par une désaturase. Pendant cette réaction, le stéaryl-CoA est transformé en oleyl-CoA en présence de l'NADPH et de l'oxygène moléculaire. Une réaction similaire est nécessaire pour la formation de lanostérol à partir du squalène. Les acides gras non saturés et les stérols sont importants pour la formation et la fonction des systèmes élaborés constituant les membranes de la cellule de levure. Les cellules de levure cultivées en anaérobiose contiennent seulement de petites quantités d'acides gras non saturés et de stérols. Ces composés agissent comme facteurs de croissance en l'absence d'oxygène. Les lipides de la cuticule de raisin peuvent activer la croissance des levures en anaérobiose. Cette observation explique partiellement que la fermentation des vins rouges, qui s'effectue en présence des pellicules, soit plus rapide que celle des vins blancs.

Mots clés : *Oenologie — Levure — Développement anaérobie — Acides gras insaturés — Stérols — Lipides — Rôle activateur.*

Introduction

Il est généralement admis que le développement des levures, c'est-à-dire la croissance et la multiplication, est une précondition nécessaire pour la fermentation. Une fermentation n'est pas possible s'il n'y a pas de cellules de levures ou d'enzymes. Bien que la cellule de levure ait une capacité synthétique remarquable, quelques facteurs additionnels sont nécessaires en sus des nutriments normaux. On peut classer ces facteurs additionnels nommés vitamines en deux groupes : les facteurs essentiels, absolument nécessaires à la croissance et les acti-

vateurs de la fermentation, qui favorisent et accélèrent la croissance, mais ne sont pas indispensables (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1975).

Malheureusement, le problème s'avère plus complexe qu'il n'y paraît d'abord, car le besoin en facteurs additionnels n'est pas le même selon les levures mais diffèrent d'espèce à espèce et même de souche à souche. Ainsi un facteur essentiel pour une souche peut-être stimulant pour une autre et sans effet pour une troisième. Les facteurs les plus importants sont biotine, acide pantothénique, et mésoinositol (SUOMALAINEN et OURA, 1971). Les fonctions de la biotine et de l'acide pantothénique sont bien connues : la biotine est le cofacteur de certaines décarboxylations, carboxylations, désaminations et intervient sur la synthèse de l'acide pantothénique. L'acide pantothénique est un précurseur de CoA, un coenzyme indispensable pour des acétylations, impliqués dans le métabolisme des lipides. Le rôle métabolique de méso-inositol n'est pas bien connu. Ce facteur est nécessaire en plus grandes quantités que les autres vitamines. L'inositol est une partie de phosphotidyl-inositol de la membrane cellulaire. Les autres facteurs pyridoxine, thiamine, nicotinamide, acide *p*-aminobenzoïque, acide ptéroyl-glutamique et rifoflavine sont nécessaires parfois seulement. Leurs fonctions métaboliques sont bien connues, car ce sont des composantes de quelques coenzymes (LEHNINGER, 1975).

Facteurs de croissance anaérobie des levures

Tous ces facteurs ont une influence sur la croissance des levures en aérobiose et en anaérobiose, c'est-à-dire en présence ou en l'absence de l'oxygène. Pourtant, on sait depuis longtemps que les levures ont besoin d'oxygène (PASTEUR, 1860), particulièrement pendant la sporulation. La formation des ascospores des levures se déroule seulement en présence de l'oxygène.

En plus des facteurs de croissance, essentiels pour quelques levures, et des facteurs stimulants pour quelques souches, quelques autres facteurs accélèrent la fermentation d'une manière non élucidée (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1975). Ce sont des extraits concentrés de levures et de produits d'origine fongique provenant de mycelium d'*Aspergillus* ou de *Botrytis*. En outre, il a été montré que de petites quantités d'acétaldéhyde et l'acide pyruvique peuvent avoir un effet favorable sur la croissance et la fermentation des levures.

Les stérols et les acides gras non saturés ont un effet important, décrit par ANDREASEN et STIER (1953, 1954), seulement dans le cas de la croissance anaérobie. Les levures sont des organismes eucaryotiques qui possèdent des systèmes de membranes élaborés contenant des stéroïdes et des acides gras non saturés. Un exposé sur la fonction des stérols dans les membranes a été donné par DEMEL et DE KRUYFF (1976). L'effet des acides gras non saturés et des stéroïdes particulièrement de l'ergostérol, s'exerce seulement dans les conditions d'anaérobiose stricte, c'est-à-dire en l'absence absolue d'oxygène moléculaire. L'oxygène moléculaire semble être le facteur de croissance le plus important pour les levures. Le besoin d'oxygène moléculaire vient de ce que certaines enzymes du métabolisme anabolique ne peuvent réagir que directement avec l'oxygène qui ne peut être remplacé par d'autres accepteurs d'hydrogène. Ces enzymes sont des oxygénases ou des désaturases impliquées dans la synthèse des acides gras non saturés et des stérols (HUNTER et ROSE, 1971). Une valeur K_m apparente de 0,3 μMol O_2 a été déter-

minée par ROGERS et STEWART (1973) pour la synthèse des stérols et des acides gras non saturés. La quantité d'oxygène nécessaire pour la respiration est beaucoup plus élevée.

L'incapacité des levures à synthétiser des acides gras non saturés et les stérols est démontrée par la composition des lipides des cellules de levure cultivées en présence ou en absence d'oxygène moléculaire (tabl. 1) (GORDON et STEWART,

TABLEAU I

Ergostérol et acides gras non saturés des cellules de levure cultivées en anaérobiose ou en aérobiose (GORDON *et al.*, 1972)

	Aération	
	Sans (anaérobies)	Aér (4h)
Ergostérol (mg/g poids sec)	0,21	4,2
Acides gras non saturés (mg/g poids sec)	5,3	71
P. 100 d'acides gras non saturés	19	77

1972). Les cellules de levures pauvres en stérols et acides gras non saturés présentent une capacité réduite de synthèse des protéines. Des études de l'ATPase de membranes ayant un contenu variable en stérols ont montré que les stérols favorisent le passage « gel en phase liquide » à membranes biologiques (COBON et HASLAM, 1973).

Le besoin en stérols des levures a été démontré pour la première fois par ANDREASEN et STIER (1953); depuis cette observation importante a été confirmée par plusieurs auteurs (DAVID et KIRSOP, 1973; HAUKELI et LIE, 1971*ab*). Le stérol principal dans les cellules de levures cultivées en présence d'oxygène moléculaire, est l'ergostérol. Outre ce stérol quelques autres sont présents en quantités plus faibles (BARTON *et al.*, 1972). La composition de la fraction stérolique présente à l'état libre et estérifié dépend des conditions de culture et de l'âge de la levure (BAILEY et PARKS, 1975).

Désaturation des acides gras

Une réaction importante dans le processus de la biosynthèse des acides gras non saturés par les levures est la désaturation d'un acide gras saturé (BLOOMFIELD et BLOCH, 1960). La désaturation de l'acide palmitique mène à l'acide palmitoléique. La désaturation de l'acide stéarique mène à l'acide oléique, voir figure 1. Les acides gras non saturés à plus de 18 atomes de carbone ou plus d'une double liaison sont synthétisés par l'addition des groupes-C_2 et/ou par une autre désaturation.

La double liaison est introduite par un système de monooxygénase. Une

molécule d'oxygène moléculaire est utilisée comme accepteur pour deux paires d'électrons, une paire dérivée de l'acyl CoA de l'acide gras saturé et l'autre de NADPH. Ainsi la réaction totale est :

$$\text{Palmitoyl-CoA} + \text{NADPH} + H^+ + O_2 \rightarrow \text{Palmitoleyl-CoA} + \text{NADP}^+ + 2H_2O$$

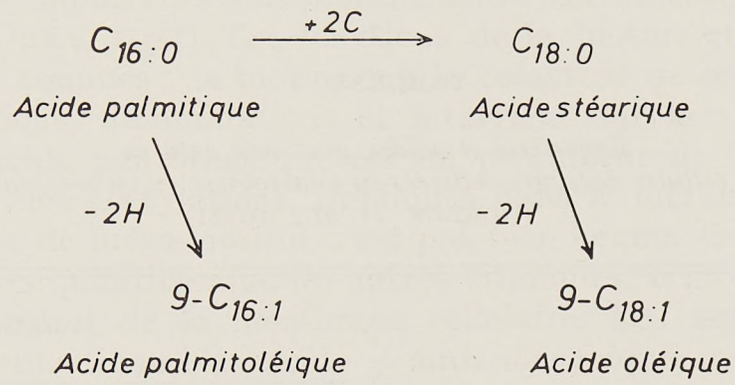


FIG. 1. — *Formation des acides gras non saturés à partir de l'acide palmitique.*

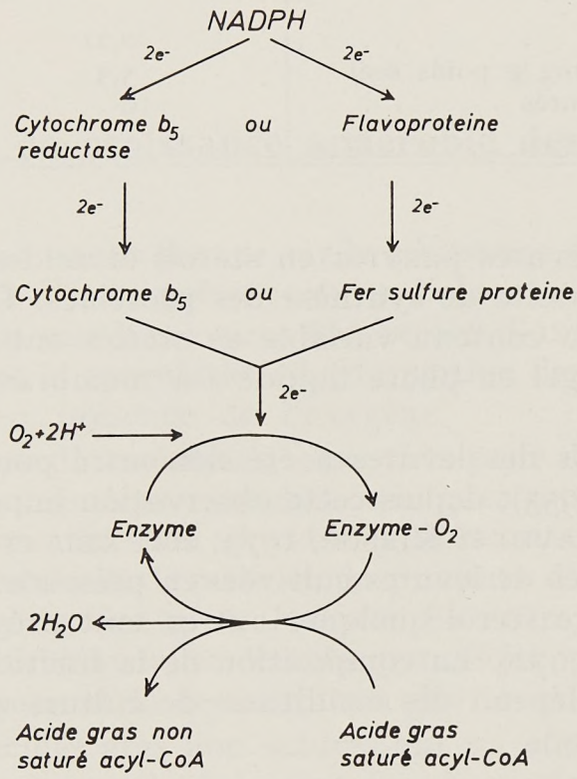


FIG. 2. — *Transport d'électron pour la désaturation des acides gras.*

Les électrons nécessaires pour la désaturation sont fournis par un système de transport d'électron (fig. 2).

Deux mécanismes sont possibles. Les électrons peuvent être transférés sur le cytochrome b_5 par une cytochrome b_5 réductase ou par une flavoprotéine à protéine qui contient : sulfure et fer. Le premier système qui est typique du métabolisme animal est sensible au cyanure.

Le système des levures n'est pas aussi sensible au cyanure que le système des animaux (microsome de foie de rat), ce qui suggère une différence entre les deux systèmes, TAMURA *et al.* (1976), ont montré que les équivalents réduisants nécessaires pour la réaction de désaturation sont fournis par la forme réduite du cyto-

chrome b_5. Pourtant ce cytochrome n'est pas l'enzyme terminale du système de désaturation de levure. On en conclut que le système de transport d'électrons dépendant de NADH, qui agit pendant le processus de désaturation des acides gras, par des microsomes de levure peut être exprimé comme suit :

$$\text{NADH} \xrightarrow[\text{réductase}]{\text{NADH-cyt.}b_5} \text{cyt.}b_5 \rightarrow \text{FSC} \begin{cases} \nearrow \; O_2, \text{ palmitoyl-CoA} \\ \searrow \; 2H_2O, \text{ palmitoleyl-CoA} \end{cases}$$

(FSC est le facteur sensible au cyanure)

La palmitoyl-CoA désaturase est réprimée quand les cellules de levure sont cultivées en présence d'acides gras non saturés (Tween 80) (TAMURA *et al.*, 1976). Une souche de levure auxotrophique pour des acides gras non saturés c'est-à-dire qui exige des acides gras non saturés pour sa croissance n'a pas d'activité palmitoyl-CoA désaturase. Comme dans les deux cas NADH- et NADPH cytochrome *c* réductase et cytochrome b_5 sont trouvés à une teneur normale on peut conclure que ces cellules sont dépourvues de FSC essentiel pour assurer le fonctionnement normal de ce système.

ANDREASEN et STIER (1954) avaient déjà montré que le besoin en acides gras non saturés des cellules de levures peut être satisfait non seulement par l'acide oléique qui est le plus efficace mais aussi par l'acide linolique et l'acide linolénique.

TABLEAU 2

Acide gras facteurs de croissance des levures en anaérobiose (LIGHT *et al.*, 1962)

Acide gras	Activité
Acide oléique	+++
Acide 9 (et 10) hydroxy stéarique	+++
Acide 11-cis-octadécénoique	+++
Acide 9-octadécynoique	+++
Acide 12-hydroxy stéarique	++
Acide 11,12-methylene stéarique	++
Acide 12-céto stéarique	++
Éthyl 9 (et 10)-acetoxystéarate	++
Éthyl 9 (et 10)-hydroxystéarate	+++
Acide 9 (et 10)-acetoxystéarique	+++

La quantité d'acide oléique nécessaire pour produire des populations stationnaires de 180 à 250.10^6 cellules/ml est de 0.2-0.4 µMol d'acide oléique/ml soit environ 1 µg d'acide oléique pour produire 10^7 cellules. LIGHT *et al.* (1962) ont étudié l'activité de quelques acides gras C_{16}-C_{18} sur la croissance des levures. Les acides actifs ont un groupe hydroxyle ou une cis double liaison, une triple liaison ou un noyau cyclopropane au milieu des molécules. Des cellules de levure cultivées en anaérobiose transforment l'acide 9- et (10-) hydroxy-stearique en des composés acétoxy qui sont actifs aussi (tabl. 2). WALENGA et LANDS (1975, *a*, *b*) ont récemment étudié l'influence de différents acides gras non saturés sur la croissance et la respiration de *Saccharomyces cerevisiae*.

Quelques mutants auxotrophiques de *Saccharomyces cerevisiae* cultivés en aérobie ayant besoin d'acides gras non saturés n'ont pas d'activité Δ^9 désaturase et pour cette raison sont incapables de transformer l'acide palmitique et l'acide stéarique en acide palmitoléique et en acide oléique (KEITH *et al.*, 1969).

Synthèse des stérols

La synthèse des stérols peut être divisée en trois parties : la synthèse de mévalonate, la conversion de mévalonate en squalène, et la cyclisation de squalène en stérol (HUNTER et ROSE, 1971).

Le squalène peut être formé par des levures en l'absence d'oxygène. L'oxygène n'est donc pas nécessaire à la biosynthèse du squalène. Le lanostérol est le premier stérol formé par la cyclisation du squalène. La conversion du squalène en lanostérol nécessite de l'oxygène moléculaire, $NADPH_2$ et fer. Évidemment,

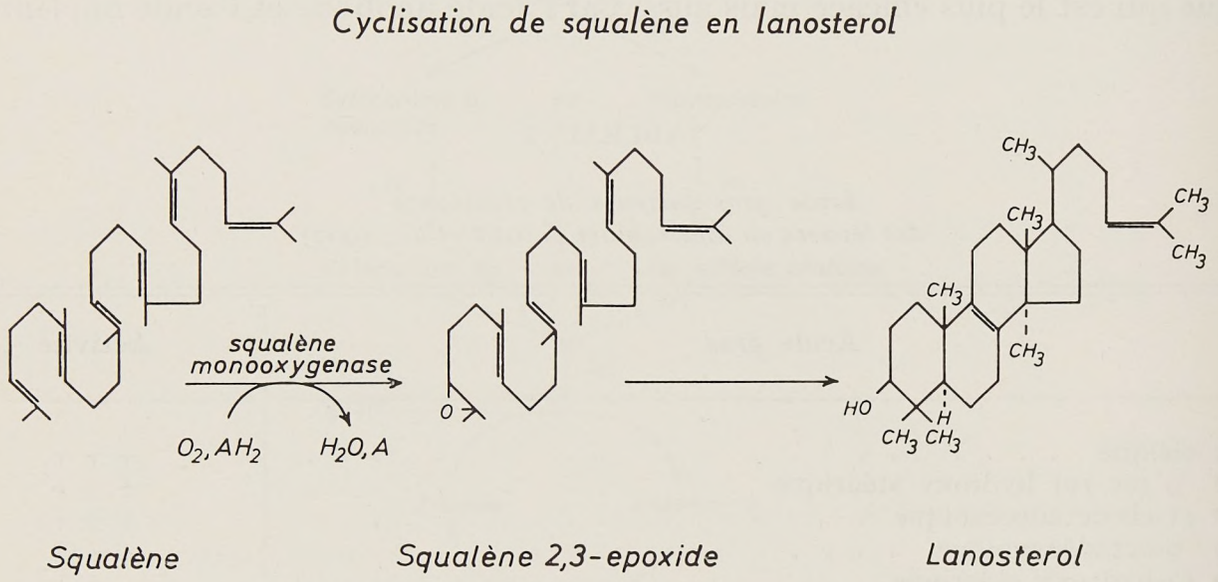


FIG. 3. — *Cyclisation de squalène en lanostérol.*

quelques enzymes catalysent cette réaction et le squalène-2,3-époxide est un produit intermédiaire (fig. 3). Comme dans le cas de la biosynthèse des acides gras non saturés l'oxygène moléculaire ne peut pas être remplacé par d'autres accepteurs d'hydrogène. C'est la raison pour laquelle il faut ajouter des stérols pour la croissance des levures en anaérobiose.

PROUDLOCK *et al.* (1968) ont montré que *S. cerevisiae* peut utiliser des stérols différents et n'a pas besoin de stérols particuliers. Quelques stérols de la série de cholestane saturé, de la série de cholestane non saturé et de la série de l'anostane ont été trouvés actifs sur la croissance de levures en anaérobiose. D'après les résultats de PROUDLOCK *et al.* (1968) pour qu'un stérol soit actif, il doit : être plan (α configuration en C-5), avoir une chaîne alkylique à en < 17, avoir un groupe hydroxylé.

On a récemment montré que des cellules de levure différentes par la composition de leurs stérols peuvent être cultivées en anaérobiose en présence de diffé-

rents stérols. On a observé de petites différences dans la capacité de résistance à l'extension de la membrane cytoplasmique.

Des mutants auxotrophes nécessitant des acides gras non saturés ont été isolés. Pourtant, il n'a pas été possible d'obtenir des mutants ayant besoin de stérols dans des conditions aérobies.

Lipides du raisin

Le moût de bière peut contenir les facteurs lipidiques nécessaires à la croissance des levures en anaérobiose. Pourtant, cela n'est pas d'une importance primordiale, car il est d'usage courant d'aérer le moût de bière pour obtenir un bon

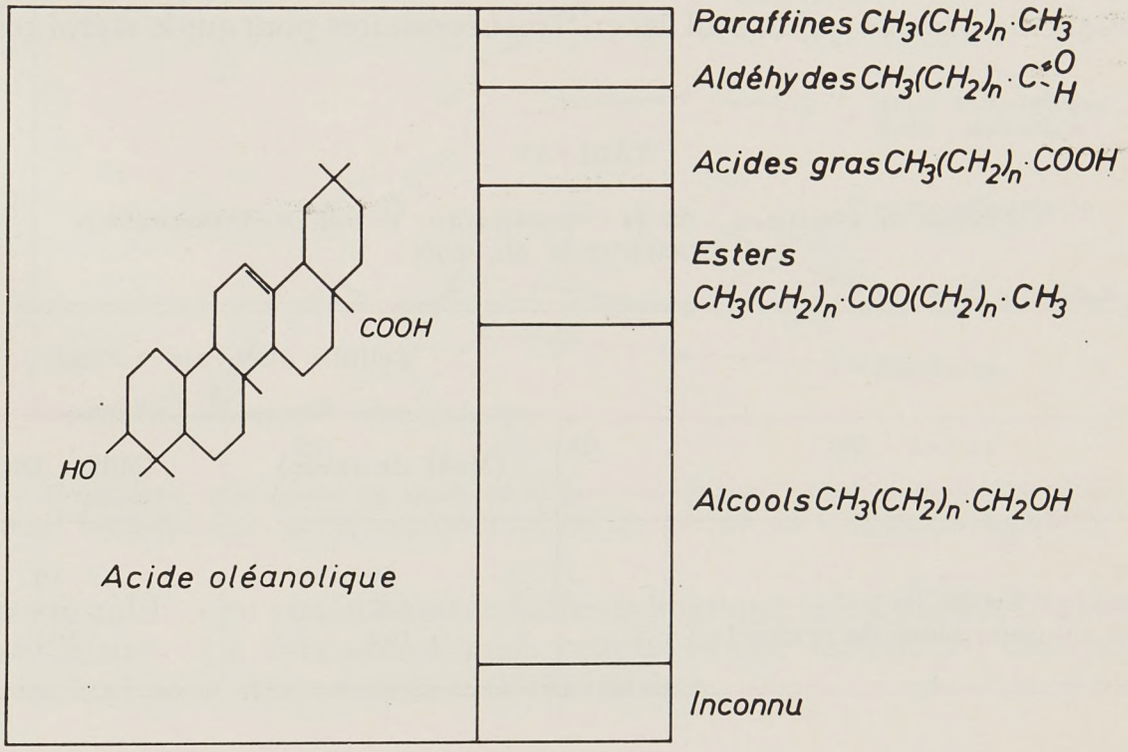


FIG. 4. — *Composition de la cire cuticulaire du raisin.*

développement des levures. Nous n'avons que peu d'informations quant à la constitution du moût et du vin : il est probable que le jus de raisin contient peu de stérols et d'acides gras non saturés. Pourtant les raisins et les feuilles de vigne (DOURMISHIDZE *et al.*, 1976) contiennent des lipides en quantité considérable. Les pépins sont particulièrement riches en lipides et l'huile de pépins contient des quantités considérables d'acides gras non saturés. Une autre source de lipide est la pellicule du raisin couverte par la cire cuticulaire. Les deux tiers environ de la cire cuticulaire sont constitués d'un triterpène, l'acide oléanolique (RADLER, 1968). Le résidu nommé cire molle est composé essentiellement d'un grand nombre de composés saturés à longue chaîne : alcool, aldéhydes, acides gras, hydrocarbures (fig. 4). La quantité exacte des composés non saturés n'est pas connue, mais DRAWERT *et al.* (1976) ont trouvé que la faible fraction des paraffines contient environ 11 p. 100 des composés non saturés. On peut donc conclure que les autres fractions contiennent aussi une quantité similaire des composés non saturés.

Pourtant, ces deux sources de lipides sont de peu d'intérêt dans le moût parce que les lipides sont liés assez fortement comme dans les pépins ou insolubles comme dans les cires cuticulaires. En outre, les pépins et les pellicules sont enlevés du moût pendant la vinification du vin blanc. Pendant la vinification du vin rouge et la macération carbonique le moût reste en contact avec les autres particules des raisins pendant une période considérable. Or, on sait que la fermentation du vin rouge est généralement beaucoup plus rapide que la fermentation du vin blanc. Ce n'est certainement pas dû à un seul facteur mais à l'action combinée de plusieurs facteurs physiques et chimiques. La présence des substances solides peut accélérer la fermentation en facilitant le dégagement du gaz carbonique et en retardant la sédimentation des levures. Il a été montré par BRECHOT *et al.* (1966) que la cire cuticulaire a un effet favorable sur la fermentation (tabl. 3).

Dans une autre publication (BRECHOT *et al.*, 1971) il a été montré que l'acide oléanolique, composé essentiel de la cire cuticulaire du raisin, a une influence favorable sur la fermentation (tabl. 4). Ceci est assez remarquable car l'acide oléanolique ne possède qu'un seul des critères nécessaires pour que le stérol soit actif

TABLEAU 3

« Facteur de croissance » de la cire cuticulaire du raisin en anaérobiose
(BRECHOT *et al.*, 1966)

	Cellules de levure (10^6/ml)	
	(Moût de raisin)	(Milieu Difco)
Témoin	50	19
Ergostérol + Tween 80	107	40
(Extrait chloroformique de pruine (1,5 g/l)	102	104

TABLEAU 4

Action des facteurs de croissance anaérobie
(BRECHOT *et al.*, 1971)

Facteur additionné	Cellules de levure (10^6/ml)	
	24 h	48 h
Témoin	52	56
Ergostérol	57	68
Acide oléique	57	75
Ergostérol + acide oléique	80	86
Acide oléanolique	87	100
Acide oléanolique + acide oléique	70	106

comme facteur de croissance des levures (PROUDLOCK *et al.*, 1968). L'acide oléanolique contient un groupe alcoolique, mais pas de chaîne alkylique en C-17. Pourtant, il est certain que l'acide oléanolique a un effet favorable sur la croissance des levures en anaérobiose. Sur milieux synthétiques et dans des conditions strictement anaérobies il a été possible de montrer l'activité de l'acide oléanolique (fig. 5).

Si l'acide oléanolique est solubilisé avec un mélange d'éthanol et de propanol ajouté en quantité qui n'empêche pas la croissance des levures, l'effet de l'acide oléanolique est comparable à celui de l'ergostérol. L'acide ursolique, tritérpène de la cire cuticulaire de pomme, a une activité similaire. Ceci suggère que le besoin

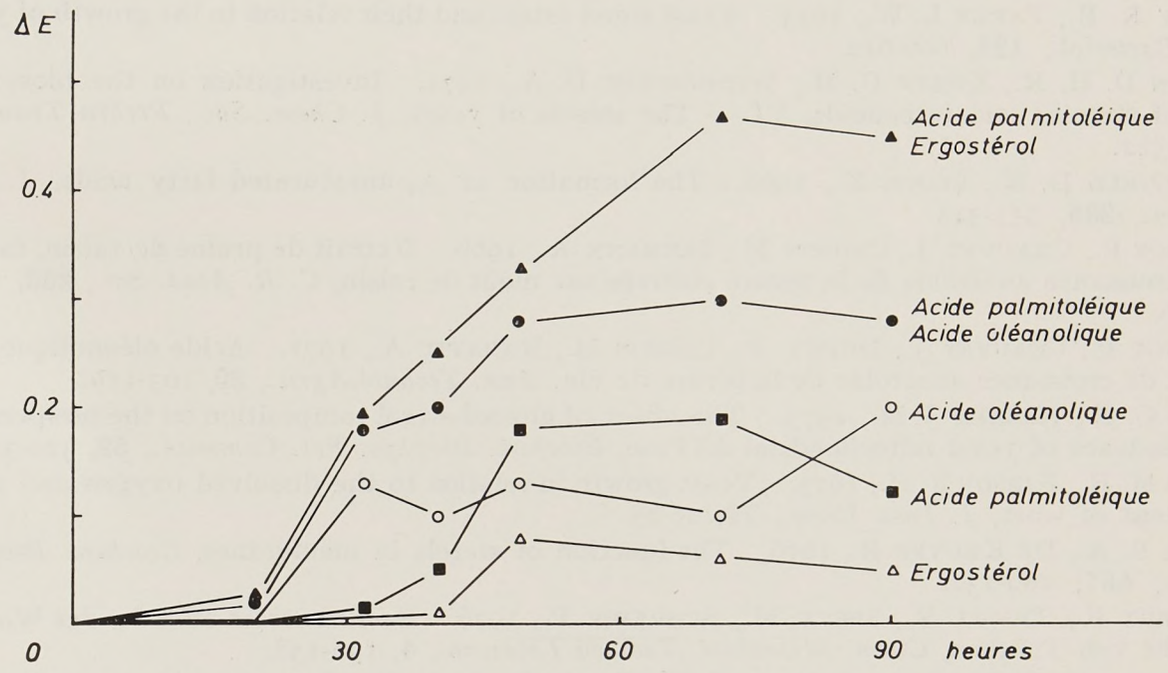


FIG. 5. — *Croissance de la levure en anaérobiose (densité optique) : acide palmitoléique (120 mg/l), acide oléanolique (20 mg/l), ergostérol (20 mg/l) : (Stockinger et Radler, non publié).*

de la levure cultivée en anaérobiose en facteurs lipidiques n'est pas limité aux acides gras non saturés et à l'ergostérol, mais peut aussi être satifait par des composés similaires, qui sont des constituants du raisin.

Summary

Promotors of the yeast anaerobic growth

It is well known that yeasts as eucaryotic organisms have a requirement for molecular oxygen, that cannot be replaced by other electron acceptors. The molecular oxygen is necessary for the synthesis of unsaturated fatty acids from saturated fatty acids by a desaturase. In this reaction stearyl-CoA is converted to oleyl -CoA in the presence of NADPHand molecular oxygen. A similar reaction is necessary for the formation of lanosterol from the hydrocarbon squalene. Unsaturated fatty acids and sterols are important for the formation and function of the eleborate membrane systems of the yeast cell. Yeast cells grown in the absence of oxygen contain very small amounts of unsaturated fatty acids and sterols. These compounds serve as growth factors in the absence of oxygen. Lipids of the grape cuticle can act as growth promoting factors for the anaerobic rowth of yeast. This observation may partially explain that the fermentation of red wines which are not separated from the skins proceeds at a faster rate than that of white wines.

Key-words: *Oenology — Yeast — Anaerobic growth — Unsaturated fatty acids — Sterols — Lipiols — Promoting role.*

Références bibliographiques

ANDREASEN A. A., STIER T. J. B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* I — Ergosterol requirement for growth in a defined medium, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, 23-36.

ANDREASEN A. A., STIER T. J. B., 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevesiae*, II — Unsatured fatty acid requirement for growth in a defined medium, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 271-281.

BAILEY R. B., PARKS L. W., 1975. Yeast sterol esters and their relation to the growth of yeast, *J. Bacteriol.*, **124**, 606-612.

BARTON D. H. R., KEMPE U. M., WIDDOWSON D. A., 1972. Investigation on the biosynthesis of steroids and terpenoids, VI — The stérols of yeast, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 413-522.

BLOOMFIELD D. K., BLOCH K., 1960. The formation of Δ_9-unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **235**, 337-345.

BRECHOT P., CHAUVET J., CROSON M., IRRMANN R., 1966. Extrait de pruine de raisin, facteur de croissance anaérobie de la levure cultivée sur moût de raisin, *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1004-1006.

BRECHOT P., CHAUVET J., DUPUY P., CROSON M., RABATTU A., 1971. Acide oléanolique, facteur de croissance anaérobie de la levure de vin. *Ann. Technol.Agric.*, **20**, 103-110.

COBON G. S., HASLAM J. M., 1973. The effect of altered sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 320-326.

DAVID M. H., KIRSOP B. H., 1973. Yeast growth in relation to the dissolved oxygen and sterol content of wort, *J. Inst. Brew.*, **79**, 20-25.

DEMEL R. A., DE KRUYFF B., 1976. The function of sterols in membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 109-132.

DRAWERT F., TRESSL R., SPECK M., SCHREIER P., 1976. Kohlenwasser stoff in der Wachsschicht von Trauben, *Chem. Mikrobiol. Technol Lebensm.*, **4**, 136-138.

DOURMISHIDZE S. V., ZAMBAKHIDZE N. E., TUSHISHVILI L. Sh., KEKELIDZ N. A., 1976. Die sterole der Rebsorte Saperavi, *Soobshch. Akad. Nauk Gruzinsk*, SSR (Tbilisi), **82**, 177-180; (cité par *Vitis*, **15**, 259).

GORDON P. A., STEWART P. R., 1972. Effect of lipid status on cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis in anareobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 231-242.

HAUKELI A. D., LIE S., 1971*a*. Effect of lipids and oxygen on yeast growth and the biosynthesis of acetoin during fermentation, *J. Inst. Brew.*, **82**, 161-165.

HAUKELI A. D., LIE S., 1971*b*. Experimental conditions affecting yeast growth, *J. Inst. Brew.*, **77**, 253-258.

HUNTER K., ROSE A. H., 1971. Yeast lipids and membranes *in The Yeasts*, Vol. 2, Physiology and biochemistry of yeasts p. 211-270, A. H. Rose et J. S. Harrison eds., Academic Press, London New York.

KEITH A. D., RESNICK M. R., HALEY A. B., 1969. Fatty acid desaturase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **98**, 415-420.

LEHNINGER A. L., 1975. *Biochemistry*, Wort Publ., New York.

LIGHT R. J., LENNARZ W. J., BLOCH K., 1962. The metabolism of hydroxystearic acids in yeast, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1793-1800.

PASTEUR L., 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique. Annales de Chimie et de Physique, 3e série, Tome LVIII, Masson, Paris.

PROUDLOCK J. W., WHEELDON L. W., JOLLOW D. J., LINNANE A. W., 1968. Role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 434-437.

RADLER F., 1968. La cire cuticulaire des grains de raisin et des feuilles de la vigne, *Conn. Vigne Vin*, **3**, 271-294.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1975. *Sciences et Techniques du Vin*, Tome **2**, 321-350, Dunod, Paris.

ROGERS P. J., STEWART P. R., 1973. Mitochondrial and peroxisomal contributions to the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture, *J. Gen. Microbiol.*, **79**, 205-217.

SUOMALAINEN H., OURA E., 1971. Yeast nutrition and solute uptake, *in the Yeasts*, Vol. **2**, 3-74, A. H. Rose et J. S. Harrison eds, Academic Press, London New-York.

TAMURA Y., YOSHIDA Y., SATO R., KUMAOKA H., 1976. Fatty acid desaturase system of yeast microsomes. Involvement of Cytochrome b_5-containing electron-transport chain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 284-294.

WALENGA R. W., LANDS W. E. M., 1975*a*. Effectiveness of Various Unsaturated fatty acids in supporting growth and Respiration in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9121-9129.

WALENGA R. W., LANDS W. E. M., 1975*b*. Requirements for unsaturated fatty acids for the induction of respiration in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9130-9136.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 215-217

INTERVENTION

Les stéroïdes « facteurs de survie » des levures au cours de la vinification

Mme S. LAFON

Institut d'Œnologie,
Université de Bordeaux II (France)

Comme vient de l'exposer M. le Professeur RADLER, les stéroïdes agissent en anaérobiose stricte comme facteur de croissance des levures.

Des recherches actuellement en cours à l'Institut d'Oenologie, poursuivant le travail entrepris naguère par M. BRECHOT à l'Institut Pasteur et qui feront prochainement l'objet de la thèse de Mlle LARUE, apportent des éléments nouveaux. Dans le cas de la vinification, en effet, les conditions particulières imposées à la croissance des levures font apparaître une action différente des stéroïdes.

Lorsque des stéroïdes sont ajoutés au moût de raisin frais, aucune modification n'est observée dans les populations maximales, également dans la vitesse de fermentation pendant les premiers jours; par contre, dans la deuxième partie de la fermentation, correspondant à la phase de déclin du cycle de croissance levurien, on relève des populations viables 2 à 10 fois plus élevées à 25 °C, 100 fois plus élevées à 35 °C (fig. 1); la conséquence est une plus grande quantité de sucre fermenté. Nous avons proposé, pour caractériser ce rôle des stéroïdes le terme de « facteurs de survie » par analogie avec les « facteurs de croissance » qui agissent sur la multiplication donc sur la population maximale.

L'action « facteur de survie » s'exerce d'autant plus fortement que le moût est plus riche en sucre et qu'il provient de vendanges botrytisées. En outre, elle est susceptible de s'ajouter à celle des activateurs de croissance. La figure 2 montre comment les activateurs (facteurs de croissance) accélèrent la fermentation à ses débuts mais n'en modifie pas la limite; elle montre aussi que les stéroïdes (facteurs de survie) agissent uniquement vers la fin de la fermentation. La combinaison des deux types de facteurs permettant à une population plus nombreuse de conserver une viabilité prolongée, favorise l'activation maximum et une transformation plus complète du sucre.

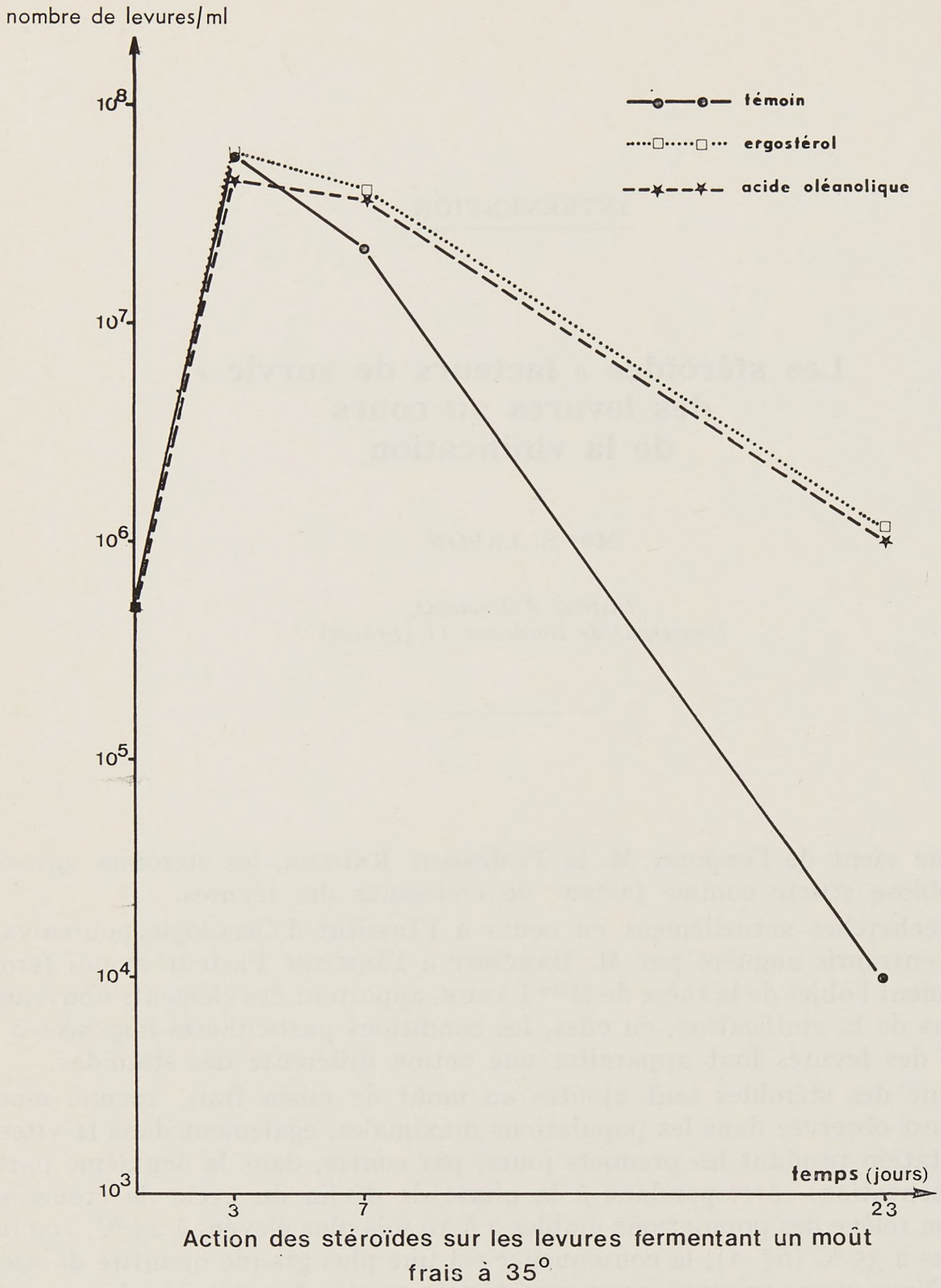


FIG. 1. — *Action des stéroïdes sur le cycle de croissance des levures au cours de la fermentation d'un moût de raisin frais à 35 °C.*

Cette action « facteur de survie » des stéroïdes s'explique par les modalités technologiques propres à la vinification. Des conditions d'anaérobiose stricte s'instaurent dès le logement du moût en gros volume. Mais, à l'origine, le moût se trouve largement aéré et fortement inoculé par une population levurienne sauvage développée en aérobiose, toutes conditions favorables à la biosynthèse des stérols dont les besoins sont ainsi couverts pendant la première partie de la fermen-

tation. Cependant, du fait de la concentration en sucre élevée, la fermentation se prolonge pendant la phase de déclin de la population levurienne dont la teneur en stérol s'amenuise en fonction du temps.

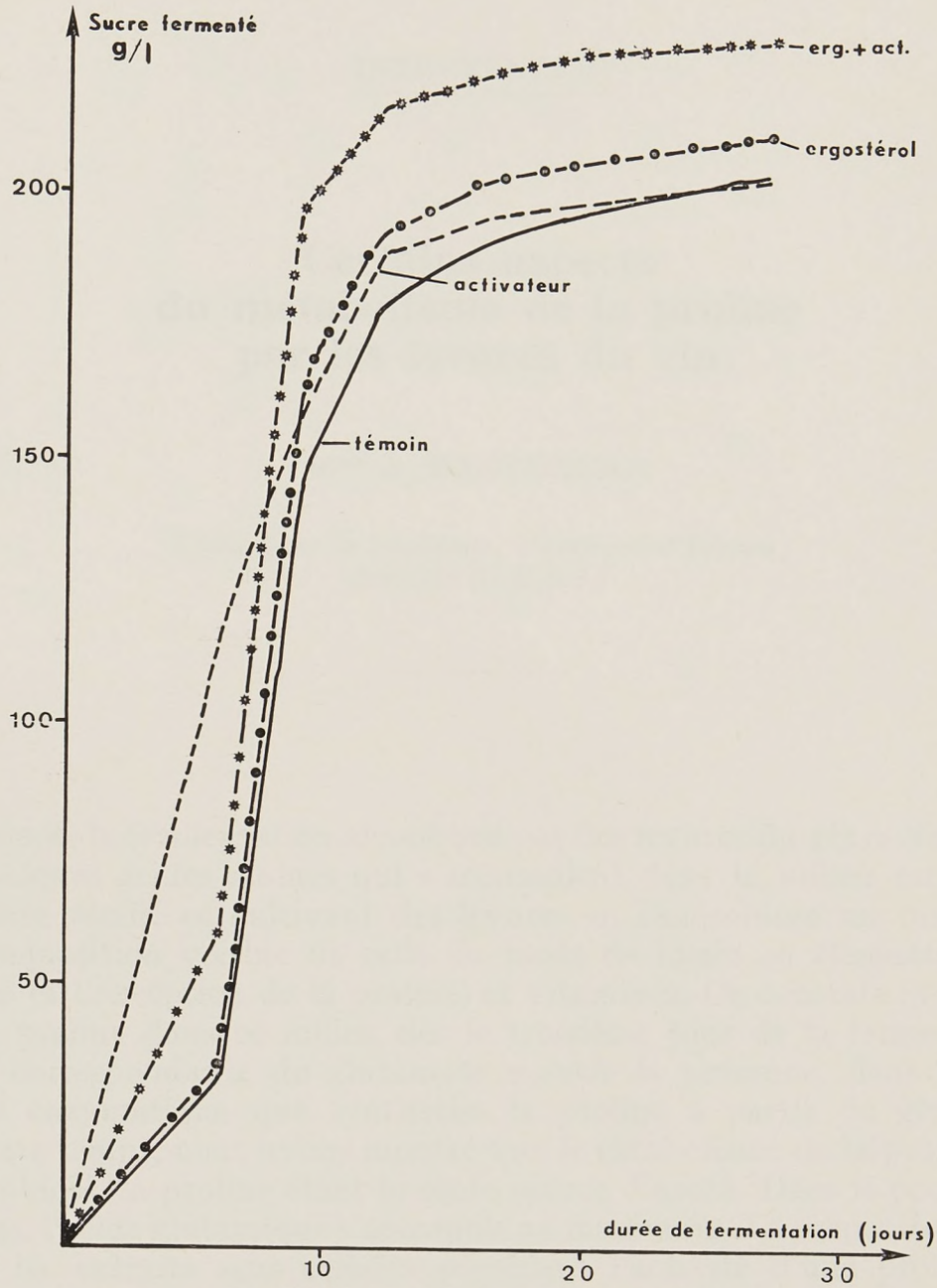


FIG. 2. — *Action des stéroïdes et des activateurs de croissance sur la fermentation d'un moût de raisin frais.*

——— témoin
- - - - - activateur
— . — ergostérol
—×—×—×— activateur + ergostérol.

Différents stéroïdes possèdent une activité « facteur de survie » mais leurs modes d'action au niveau cellulaire sont différents. En présence d'ergostérol et de cholestérol les levures conservent une teneur en stérols plus importante; au contraire, la présence d'acide oléanolique diminue la teneur en stérol des cellules.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 219

INTERVENTION

Certains aspects du métabolisme de la proline par les levures du vin

Mme A. MANTACHIAN

Laboratoire de biochimie, Université d'Erevan, Arménie (U.R.S.S.)

Au cours de la fermentation alcoolique par des levures du genre *Saccharomyces* l'un des quelques acides aminés qui s'accumulent dans le milieu est la proline. Ceci peut être vérifié en cultivant des levures en anaérobiose sur milieu synthétique de composition voisine de celle du moût de raisin en éléments minéraux, aminoacides (à l'exception de la proline) et vitamines. On constate *in vitro* la synthèse de la proline dans ce milieu dès le troisième jour de la fermentation. La diminution correspondante du glutamate montre la présence, dans les levures, du système enzymatique que synthétise la proline à partir du glutamate.

En même temps, nous avons montré que le catabolisme de la proline est possible en aérobiose, la proline étant la seule source d'azote. Dans le pool des acides aminés libres, l'acide glutamique s'accumule au maximum. La suspension de cellules intactes et les extraits sans cellules possèdent l'activité d'une proline-oxydase qui apparaît nettement à la fin de la phrase exponentielle et au milieu de la phase stationnaire.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 221-230

Élaboration et conservation des vins blancs aromatiques

H. HAUSHOFER

Höhere Bundeslehr-u Versuchsanst alt für Wein-u Obstbau
Klosterneuburg (Autriche)

Résumé

Étant donnée la grande sensibilité des vins aromatiques leur production demande des conditions particulières notamment :

— vendange des raisins au moment où les substances aromatiques ont atteint leur teneur maximum;
— la pleine maturité concernant les substances aromatiques ne s'effectue que rarement au moment où les sucres ont atteint leur maximum de concentration;
— un vin aromatique ne peut s'obtenir qu'à partir de vendange saine;
— les moisissures des raisins détruisent l'arôme primaire;
— il faut inhiber la polyphénoloxydase tout en préférant l'utilisation de SO_2 au chauffage;
— la laccase étant résistante il faut éliminer les grains pourris;
— soufrer modérément le moût immédiatement après le foulage;
— la température de fermentation doit être maintenue basse;
— le vin doit si possible être totalement fermenté;
— une décomposition biologique des acides est à éviter;
— le vin nouveau doit être clarifié artificiellement, immédiatement après la fin de fermentation;
— après la clarification le vin nouveau doit être convenablement sulfité;
— la bentonite est préférable au chauffage pour la stabilisation des substances albuminoïdes;
— le vin doit être mis en bouteilles au plus tard au début d'été. Le tirage à chaud est à éviter.

Mots clés : *Vins blancs aromatiques — Élaboration — Conservation — Modalités technologiques.*

Données du problème

La notion de « fruité »

Utilisée par un habitant d'Europe Centrale ou d'Europe Méridionale, la notion de fruité évoque des associations d'idées totalement différentes : l'un pensera à des pommes fraîches ou aux pêches des vignes; elle évoquera peut-être les agrumes

pour l'autre. Afin d'éviter désormais de telles divergences de conceptions, cette notion doit tout d'abord être définie : il faut entendre par « fruité » le spectre des odeurs qui va de la fleur de vigne et de sureau à l'essence de coriandre en passant par les pommes fraîches, au palais il va même jusqu'à la pêche fine. Malgré des recherches intensives sur les arômes au cours de ces dernières années, les connaissances sur le spectre des substances aromatiques correspondantes sont encore restées très incomplètes. Nous savons cependant que les constitutions aromatiques spécifiques résultent des éléments primaires du raisin (PAUL, 1963) et des conversions secondaires dues entre autres aux levures, à la technologie. Ceci explique aussi la diversité des vins selon l'année, le cépage, l'origine, la maturation, le moment des vendanges, etc... En principe, on peut cependant dire qu'un vin blanc provenant de la Gironde, d'Andalousie ou de Sicile présente un caractère complètement différent d'un vin blanc provenant de la Champagne, du Rheingau ou de la Wachau. L'habitant d'Europe méridionale, habitué à son type de vins, sera vraisemblablement quelque peu réservé devant les vins du dernier groupe et trouvera peut-être qu'ils « manquent de maturité »; en revanche, l'habitant d'Europe centrale trouvera certains vins blancs d'Europe méridionale « sans expression » et un peu uniformes.

Maturation, pleine maturité, Maturité aromatique, surmaturation

PAUL (1970) attribue ces différences aux modifications des composants du vin au cours de la maturation, composants constituant l'arôme primaire pour une maturation normale et arôme secondaire pour une surmaturation. Mais ici intervient aussi la notion de pleine maturité, lorsque l'extrait (sucré) dans le grain est à son maximum, et ceci sans phénomène de flétrissure. A cette pleine maturité déterminée par le sucre on peut opposer la pleine maturité aromatique des régions septentrionales. On la trouve surtout dans les cépages suivants : Müller Thurgau, Grüner Veltliner, Schenrebe et Riesling Vaudois, un peu moins dans le Riesling Rhénan, le Sylvaner et le Muscat et seulement après la maturité correspondant à la formation maximale de sucre dans le Neuburger, le Weissburgunder, le Traminer, le Rulander, le Zierfändler. De ses essais sur l'échelonnement des dates des vendanges, DU PLESSIS (1975) déduit que les pays méridionaux sont trop ensoleillés et que les pays septentrionaux le sont trop peu. Le 1-3-1971, on récolta un moût de 16° Brix et 12 g/l d'acidité; suivant les critères de la région, il manquait de maturité; contre toute attente, il dépassa en qualité des moûts de 20° Brix, heureuse exception qui fait que même les pays vinicoles septentrionaux peuvent aussi produire de bons vins. Il trouva en outre que, sans être à proprement parler un facteur de qualité, l'acétate d'octyle (1,3-1,7 mg/l) est en corrélation avec la pleine maturité et que l'on peut par conséquent le considérer comme un indicateur pour fixer la date des vendanges du cépage Steen qui a la caractéristique suivante : dès que la date de pleine maturité aromatiques est dépassée la qualité baisse plus ou moins suivant les variétés de ce cépage; cette baisse de qualité se manifeste par la neutralité, l'absence de caractère des vins, etc... Ce n'est qu'à partir du moment où l'on atteint un état de surmaturation, qu'apparaît un caractère nouveau, totalement différent de la pleine maturité aromatique, mais que l'on ne peut plus appeler fruité au sens où nous l'entendons. Mais outre la surmaturation, toute attaque du raisin par les moisissures et en particulier l'apparition du *Botrytis cinerea* provoque aussi l'altération de la base de départ qui détermine fortement le caractère fruité d'un vin. S'agit-il dans ce cas uniquement d'une altération par

le champignon ou d'un phénomène consécutif à l'oxydation accrue des substances contenues dans les grains, on n'a pas totalement élucidé la question. Les deux processus doivent probablement avoir lieu simultanément. Le fait que des altérations mécaniques des baies telles que la grêle, les piqûres de guêpes, etc... provoquent aussi une perte du caractère fruité du futur vin, constitue un indice de la prépondérance des processus d'oxydation. En conséquence, on doit éviter toute altération des baies saines et vendanger le raisin au moment de la « pleine maturité aromatique ». Comme celle-ci, dans les conditions de l'Europe centrale, varie dans une fourchette relativement grande en ce qui concerne le degré du moût, on trouve dans la majorité des cas, presque toujours le bon moment, sans qu'il soit utile de prendre des précautions particulières.

Influence de la technologie

Au cours du traitement du raisin, de la fermentation et de l'élaboration du vin se produit une série de modifications et d'interventions qui peuvent dans certains cas déterminer la production d'un vin fruité, neutre, ou même d'un vin de « Spainolcharakter » (caractère espagnol) oxydé et comme les vins de ce genre sont particulièrement sensibles aux différentes interventions, nous exposerons ci-dessous les problèmes que soulèvent toutes les phases du développement, depuis l'éclatement des grains jusqu'à la mise en bouteilles.

Influence du traitement des raisins

Aussi longtemps que l'enveloppe du grain est intacte et saine tout échange de substance se fait entre le milieu extérieur et la baie par l'appareil de contrôle naturel de la plante; ainsi n'existeront que des rapports d'échanges naturels. Cependant, lors de la destruction de cette structure, comme c'est le cas avec le foulage de la vendange, apparaît un intense échange de substances qui n'ont en soi rien à voir avec le raisin.

Abstraction faite de l'apport de substances par la contamination du marc et du moût par le matériel de transformation, il existe deux importants processus influant sur la qualité :

— le passage d'une substance de la baie dans le jus d'une part,

— l'apport d'une substance extérieure d'autre part.

Outre les substances dissoutes en phase aqueuse comme le sucre, les acides, les amino-acides, l'albumine, la pectine, etc..., les substances déterminant le goût spécifique des différents cépages sont, soit déjà préexistantes à l'état fini (par exemple : le Muscat, le Müller Thurgau, le S88, le Güiner Veltliver, etc...), soit représentent pour le moins ces éléments qui contribuent lors de la fermentation alcoolique à l'image gustative caractéristique d'un cépage. Elles se trouvent dissoutes dans le jus des grains, mais bien plus encore dans le tissu palissadique au-dessous de l'épiderme, et, comme Du Plessis (1975) put le constater, sont solubilisées plus complètement lors du contact, marc-moût que dans le moût de goutte. La confirmation empirique nous en fut donnée par nos expériences lors de la fabrication de vins de deuxième cuvée à partir d'extraits aqueux de marcs, qui pour les cépages dotés d'arôme primaire étaient souvent plus intensément

fruités que les vins produits à partir du moût. En s'appuyant sur cette expérience, il serait bon de prendre l'habitude de laisser macérer le marc plusieurs heures : 3 à 5 h, selon la température, se révélèrent convenables. Si parfois on n'obtient aucun résultat, cela peut venir du fait que le degré de dégradation cellulaire dans le grain varie avec l'année et le cépage; ainsi ces substances seront solubilisées en grande quantité pour les années riches en jus, et en petite quantité, pour les années pauvres en jus. OUGH (1969) constata une élévation du pH, de la couleur, de l'azote total, des composés phénoliques totaux, de la proline et de la potasse, mais aussi une diminution des acides titrables et de l'acide tartrique, 12 h représentent un temps de contact optimum; moins de 12 h et plus de 12 h ne sont pas des temps satisfaisants. Il est bien entendu que l'on ne peut pas généraliser sans dommages ces temps de contact valables pour les conditions de l'Europe Centrale, mais ils montrent qu'une courte macération est qualitativement avantageuse. De plus, au cours d'un temps de contact trop prolongé, apparaissent des phénomènes indésirables tels que forte coloration, goût âpre, aspect trouble, risque de fermentation et développement de bactéries.

Influence des enzymes pectolytiques

Outre les processus normaux d'élution, le foulage des raisins déclanche des contacts intimes entre les substrats spécifiques du raisin et leurs enzymes. Ce qui nous intéresse ici en particulier, c'est la présence dans le raisin d'enzymes pectolytiques, qui dans cette phase de la macération ont une très grande influence sur les transformations.

Les pectines non encore dissoutes et fixées sous forme de protopectines aux fragments cellulaires de nature cellulosique, semi-cellulosique et albuminique sont transportées sous forme soluble par des enzymes pectolytiques propres aux cellules au cours de la macération du marc.

Mais la réserve végétale de telles enzymes étant très faible certaines années, et les températures de réaction plus rarement favorables au moment des vendanges en Europe Centrale, le résultat d'un tel processus, sera parfois très bon, mais le plus souvent peu satisfaisant. Dans la plupart des régions vinicoles européennes on a utilisé des enzymes pectolytiques pour le traitement du marc des raisins blancs et rouges dans le but de favoriser ainsi le passage dans le jus de l'arôme, de la couleur, de l'extrait et des substances minérales. L'emploi de ces enzymes permet plus rarement d'obtenir davantage d'élément aromatiques fruités (HAUSHOFER et MEIER, 1976). Pour établir les temps de macération optima, une grande partie des difficultés lors de l'élaboration de vins fruités, semble résider dans les fortes variations de la composition du raisin. Un temps trop long est en général plus mauvais qu'un temps trop court, et le caractère fruité des vins est plus important qu'une constitution plus pleine.

Influence de l'oxygène

« Plus nous préservons de l'air la vendange foulée et le marc encore incomplètement pressuré, plus le goût des produits obtenus s'affine », écrivent BABO et MACH en 1910 et on peut lire ailleurs que l'ancien usage d'aérer les moûts, par exemple en Champagne, en Lorraine et dans le Palatinat nuit à la couleur des vins

blancs. TROOST lui-même pense que l'aération des moûts produits des vins vieillis et avancés, que la quantité d'O_2 inévitablement fixée dans le moût par le pressurage est suffisante, et qu'il n'est pas utile d'en rajouter exprès.

Ces conseils, et bien d'autres recommandations encore de traitement « réducteur » du raisin conduisirent à la création d'appareils et de systèmes d'élaboration visant à exclure toute influence d'O_2 par protection sous gaz inerte (GUILLOT de SUDUIROT, 1962; SCHAFER, 1968) et il nous faut ici reconnaître que nous avons au cours de ces dernières années suivi une orientation semblable quoique moins absolue. Le principe d'éviter l'influence de l'O_2 lors du traitement du raisin fut adopté avec succès par presque tous les œnologues autrichiens, tant pour la phase précédant la fermentation que, et surtout, pour la phase lui succédant.

A la lecture attentive de la bibliographie, il semble que sous la poussée de nouvelles découvertes techniques relatives à l'élaboration du vin, la tendance s'oriente à nouveau vers la direction opposée et introduit progressivement un retour à la technologie « oxydative ». MULLER-SPATH (1977) a réuni ces découvertes dans un ouvrage remarquable et conclut que :

— l'oxydation du moût avant la fermentation n'a guère d'effet négatif sur la qualité du vin;

— pour les régions vinicoles aux températures automnales relativement favorables (basses), il n'est guère nécessaire de protéger le moût contre l'oxydation avant la fermentation;

— une méthode de travail trop réductrice peut nuire au vin.

Ces nouvelles orientations, ont été provoquées par les résultats insuffisants des essais de traitement du raisin et du vin sous protection de gaz inerte, autant que par l'emploi abusif d'anhydride sulfureux, donnant dans les cas extrêmes, le goût de « moisi », ou le goût de « groseille » (RAPP *et al.*, 1976).

L'absence totale d'oxygène ne provoque pas des modifications sensorielles désagréables, mais les favorise. C'est donc pour les éviter à l'avenir que l'on veillera à une fixation modérée d'O_2 lors de l'élaboration du vin. Le traitement sera appliqué de façon empirique, que l'on peut éventuellement contester, et ceci aussi longtemps que l'on ne connaîtra pas les causes exactes de ces modifications.

L'oxygène fixé étant transféré sur les substrats essentiellement par voie enzymatique, il faut alors se demander dans quelle mesure il est possible de ce fait d'agir sur la technologie des vins fruités. DUBERNET (1974) et RIBÉREAU-GAYON (1975) pensent que la tyrosinase (phénolase, phénoloxydase, polyphénoloxydase, o-diphénoloxydase, catécholase) et la laccase (*p*-diphénoloxydases) sont actives en puissance dans le raisin.

La tyrosinase n'existe que dans les raisins sains.

Dans le moût et le marc, la tyrosinase est détruite rapidement en présence d'un excès d'oxygène; on n'a pas jusqu'à présent élucidé le problème de savoir si l'activité décroissante correspond à une véritable « usure » ou est la conséquence d'un manque de substrat. Dans des moûts et des vins exempts d'O_2, elle se maintient par contre très bien, c'est-à-dire que le substrat subsiste. Elle présente une bonne activité entre pH 3 et 5; à pH 2,8-3,7, elle la perd très rapidement. On obtient une activité maximale à 30 °C. Si on la chauffe à 55 °C, elle perd rapidement son activité, et c'est la raison pour laquelle il faut franchir rapidement la zone qui va de 30 °C à 50 °C pour éviter les méfaits causés par l'oxydation lors du chauffage. 1 à 6 min après l'addition d'anhydride sulfureux, la concentration en oxygène ne diminue plus, mais reste constante; ce maintien de la concentration en oxygène favorisant la croissance des levures, des moûts modérément sulfités fermentent en général bien, tandis que ceux qui ne le sont pas, et dans lesquels la totalité

de l'oxygène a été consommée par voie enzymatique, laissent de ce point de vue souvent à désirer.

La laccase est beaucoup plus active que la tyrosinase, 30 fois plus dans certains cas et catalyse non seulement l'oxydation de mono- et orthodiphénols, mais aussi celle des méta- et paradiphénols, ainsi que celle de la paraphénylène diamine et de l'acide L-ascorbique. Elle n'existe que sur des grains attaqués par *Botrytis*. Après son apparition, on ne peut plus obtenir de vins fruités, les substances donnant le caractère fruité et /ou leurs précurseurs étant masqués ou détruits par l'activité enzymatique du *Botrytis*. Avec des raisins atteints de pourriture on ne peut pas produire de vin fruité, et avec des raisins partiellement atteints de pourriture, le résultat n'est que très peu satisfaisant. C'est pour cela que le maintien de la santé des raisins est l'une des conditions de l'élaboration de ces vins.

Devant ces faits, il est difficile de croire que l'oxydation du marc ou du moût ne joue aucun rôle négatif au cours de la production de vins fruités. PERSCHEID et ZURN (1976) et MÜLLER-SPÄTH (1977) reconnaissent que l'oxygène dans un moût sain à 12-14 °C n'a pas d'effet fâcheux sur le futur vin, mais qu'il agit bénéfiquement sur la fermentation.

Ceci conduit à une technologie qui, autour de 1900, était courante, au moment où aucun moût n'arrivait à fermenter s'il n'était passé par la « Mostpeitsche » de BABO. HAUSHOFER *et al.* (1975) sont parvenus par une aération totale du moût à obtenir un vin consommable ne présentant aucun préjudice perceptible d'oxydation, réserve faite cependant que ce vin était trouvé grossier et dépourvu du caractère fruité du cépage. Comme on a jusqu'à présent obtenu d'excellents résultats pour de tels vins en sulfitant modérément le marc avec environ 50 mg /l, et que l'on peut en même temps arriver par ce moyen à un contrôle microbien important il ne faudrait pas y renoncer trop hâtivement sans avoir un moyen de remplacement. Le chauffage, moins important pour le marc que pour le moût, en est un. Avec ce procédé les vins deviennent certes très fruités, mais perdent un peu le caractère du cépage et ne se développent que très lentement.

Influence de la clarification du moût, des levures, et de la fermentation

En nous appuyant sur des décennies nous recommandons depuis des années aux œnologues autrichiens d'effectuer la clarification du moût, d'enlever les mucilages avant l'ensemencement par les levures, en fonction du volume des cuves et de la température de la cave, afin de contenir l'activité des levures dans certaines limites. En s'appuyant sur les résultats expérimentaux les plus récents, il s'avère que d'après FETTEROL et WURDIG (1977) la plupart des souches de levures génératrices de sulfite forment moins de sulfite, avec une « surface intérieure » accrue, indépendamment des propriétés chimiques des substances responsables du trouble. Il se forme par conséquent moins de SO_2 dans le vin issu de moûts filtrés grossièrement que dans ceux qui ont été finement filtrés. Comme la clarification du moût exerce aussi une influence dépressive sur le futur excédent d'éthanal, il est évident qu'une séparation modérée des mucilages présente tous les avantages.

Par contre, un état très trouble du moût provoque une fermentation extrêmement tumultueuse qui peut conduire non seulement à des pertes en alcool et en arôme, mais aussi à une grande formation d'hydrogène sulfuré (WAINWRIGT, 1971).

Influence de la fermentation alcoolique

L'influence de la fermentation alcoolique pour la formation des arômes secondaires est plus importante d'autant que l'harmonie aromatique du vin résulte à la fois des substances aromatiques primaires et secondaires. L'addition de levures plus actives y compris les levures sèches, paraît utile pour arriver à la transformation totale du sucre, et ceci à une température modérée. Il faudrait pour des vins de qualité ordinaire se garder de laisser du sucre résiduaire afin d'éviter ultérieurement d'inopportunes difficultés microbiennes et pour arriver à réduire largement les substances carbonylées combinant le SO_2, éthanal, acide pyruvique et acide cétoglutarique (WURDIG et SCHLOTTER, 1969; DITTRICH et STAUDENMAYER, 1968; BLOVIN, 1966). L'importance de la masse en fermentation, la température initiale, le degré de trouble du moût sont en corrélation directe avec les pertes en CO_2, en alcool et bien entendu en substances aromatiques volatiles. Ce sont ces expériences que SALLER (1952) a développées en « fermentation réfrigérée ». On ne pratique cette méthode que dans des pays où le temps est extrêmement chaud pendant les vendanges. Cependant, du fait de l'importance des frais d'exploitation, le refroidissement de la cuve par ruissellement d'eau, plus économique, l'a largement supplantée. C'est ainsi que des pays comme l'Afrique du Sud et l'Australie, entre autres, ont pu produire des vins fruités tels que nous les entendons.

En principe, il s'agit pour cela de résoudre simultanément deux problèmes :

— prévention des pertes d'arômes pendant la fermentation;

— condensation éventuellement par l'acide carbonique de substances aromatiques volatiles déjà « lavées ».

Il est possible d'atteindre ces deux buts dans une très grande mesure avec le refroidissement par ruissellement. Il pourrait se produire un troisième phénomène : un changement dans le mécanisme de la formation de l'arôme quand les températures de fermentation sont basses. Cependant, celui-ci est certainement de moindre importance pour la constitution aromatique d'un vin.

Des études plus approfondies pour déterminer l'importance de l'effet positif obtenu en maîtrisant des microorganismes nuisibles seraient nécessaires. D'après ZIMMERMAN *et al.* (1969), les pertes en alcool surviennent pendant la fermentation en fonction de la température, du degré alcoolique, du degré d'homogénéité, de la teneur en éléments de trouble et de la vitesse de fermentation; elles s'élèvent à 0,65 p. 100 à 26 °5 C et 21° Balling, à 0,85 p. 100, à 28° Ba et 0,16 p. 100 à 55° Ba seulement. HAUSHOFER et MEIER (1976) ont obtenu à partir du moût, à la même température initiale, dans des cuves (de 250 hl chacune) non réfrigérées, un vin à 11,65 p. 100 alcool en vol, — pour la cuve soumise au ruissellement, 12,44 vol. p. 100, — pour de petits récipients d'une capacité de 1 000 et de 25 l des valeurs alcooliques bien plus élevées encore. L'arôme des vins se révélait dans les mêmes proportions; les substances aromatiques ont des points d'ébullition vraisemblablement inférieurs à celui de l'éthanol et sont par conséquent éliminées du vin en fermentation en proportion beaucoup plus grande que l'alcool. Il est donc inutile de donner une preuve plus convaincante des avantages qu'offrent des températures de fermentation basses.

Influence du soutirage et de l'évolution du vin

Dans un proche avenir on ne pourra plus, dans les conditions de l'Europe Centrale, ne pas utiliser la dégradation biologique des acides (F.M.L. = fermentation

malo-lactique); dans ce cas nous conseillons d'effectuer la désacidification par le sel double pour éviter le « goût lactique », que nous supposons être dû au diacéthyle et qui après la F.M.L. est particulièrement préjudiciable à de tels vins; RANKINE trouve que sa teneur dans des vins australiens, comprise entre 2 et 4 p.p.m., est normale, et qu'elle est perçue comme « goût lactique » à partir de 7 p.p.m. Si un vin peut être élaboré sans F.M.L., il est souhaitable pour conserver son caractère fruité : d'éviter toute arrivée d'O_2 en remplissant les cuves dès la fin de la fermentation et de clarifier immédiatement, le mieux étant pour une grosse entreprise de le faire par centrifugation et filtration sur terre d'infusoires, pour une petite entreprise par collage par kieselsol-gélatine. Il faut éviter de sulfiter avant cette clarification, à moins que le vin n'ait totalement fini de fermenter et qu'il n'y ait donc plus aucun risque d'accumulation inutile de SO_2 combiné. Cette façon de procéder exclut toute modification biogène préjudiciable et facilite le développement des vins fruités très sensibles qui, à nul autre moment n'offrent une plénitude aromatique plus grande.

Sulfitage après fermentation

D'après les recherches de RADLER, 12 mg seulement de SO_2 libre à un pH de 3,7 peuvent maîtriser certains genres de lactobacilles, et 42 mg/l, de SO_2 combiné présentent encore à un pH de 4,2, un effet de freinage sur leur multiplication. Ces quantités sont valables pour des conditions septentrionales car VAN VYK (1975) estime que dans des conditions sud-africaines il n'est plus possible d'empêcher la F.M.L., même avec 200 mg/l de SO_2 total.

Ces résultats confirment les bons résultats que nous avons obtenus en sulfitant un vin nouveau avec 40 à 60 mg/l de SO_2, quantité qui ne gêne pas l'évolution du vin nouveau et qui inhibe en outre tout préjudice causé par l'oxydation.

Il ne faut porter la teneur en SO_2 à 40-50 mg/l de SO_2 libre qu'une semaine environ avant la mise en bouteilles, et il est bon d'ajouter 80 à 100 mg d'acide L-ascorbique pour les cépages appropriés, à la condition que le vin reste en bouteille plus de six mois. C'est de cette façon qu'il est possible de conserver le caractère fruité des années durant, et ceci sans sulfitage excessif.

Influence des méthodes de stabilisation

Si l'on entend par là toutes les méthodes qui contribuent à la stabilité durable d'un vin, on y comprend alors le sulfitage, les collages, la stabilisation par le blanc d'œuf et les procédés permettant d'obtenir la stabilité microbienne du vin en bouteille.

Nous avons traité du sulfitage au chapitre précédent, et quant aux collages, il faudra employer tout au plus le collage tanin-kieselsol-gélatine ou le PVPP, selon le cas, pour des vins très colorés et le collage au ferrocyanure, pour des vins mal élaborés. Le principe fondamental doit être :

« Plus rares seront les interventions, plus élégant sera le produit fini extrêmement sensible. »

Dans le cas de la stabilisation par le blanc d'œuf, il est préférable d'utiliser le traitement à la bentonite plutôt que le chauffage, et en ce qui concerne la mise en bouteilles, d'utiliser la filtration stérilisante plutôt que la mise en bouteilles à chaud quand des moyens chimiques de conservation du vin sont autorisés.

Summary

Production and conservation of the aromatic white wines

Considering the delicateness of aromatic wines, their production demands conditions of which the following are the most important:

— Harvest at the moment when grape aromatic compounds are at a maximum.
— The time of maximum concentration of aromatic compounds rarely coincides with time of maximum sugar level.
— Utilisation of sound grapes only.
— Grape moulds destroy primary aromas.
— Inhibition of polyphenoloxydases by addition of sulphur dioxide rather than heating.
— Elimination of laccase which is sulphur resistant.
— Sulphur treatment of the must immediately after crushing.
— Fermentation at low temperatures.
— Complete fermentation of the must.
— Avoidance of biological decomposition of acids.
— Artificial clarification of young wine immediately after fermentation.
— Correct sulphur dioxide treatment after clarification.
— Stabilisation of albumin substances by bentonite rather than heating.
— Bottling of wine by the beginning of summer at the latest. Hot-bottling must be avoided.

Key-words: *Aromatic white wines winemaking — Conservation — Technological processes.*

Références bibliographiques

BLOUIN J., 1966. Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins, *Ann. Technol. Agric.*, **15**, 223-259.

DITTRICH H. H., STAUDENMAYER Th., 1968. Die Acetaldehydbildung bei der Mostgärung und bei der Süßreservebereitung, *Wein Wissenschaft*, **23**, 1-7.

DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications techniques, Thèse 3e Cycle, Université de Bordeaux II.

DU PLESSIS S., 1975. Gärungsbedingte Inhaltsstoffe und ihr Einfluß auf die Weinqualität, *4e Symposium International Œnologie*, Valence, 26-29 mai.

FETTEROL B. M., WÜRDIG G., 1977. Die Vergrößerung der « Inneren Oberfläche » des Mostes und deren Wirkung auf sulfitbildende Hefen, *Wein Wissenschaft*, **32** (1), 25-33.

GUILLOT de SUDUIRAUT D., 1962. Utilisation du gaz carbonique pour lutter contre l'oxydation des vins blancs, *Journées C.E.T.A.*

HAUSHOFER H., MEIER W., 1976. Versuche über Alkoholausbeuten, unveröffentlicht.

HAUSHOFER H., MEIER W. BAYER E., 1975. Bestehen Möglichkeiten bei der Weinbereitung auf schwefligr Säure zum Teil oder ganz zu verzichten, *Wein Wissenschaft*, **34-35**, 958-963.

MÜLLER-SPÄTH H., 1977. Neueste Erkenntnisse über den Sauerstoffeinfluß bei der Weinbereitung aus der Sicht der Praxis, *Wein Wissenschaft*, **6**, 146-157.

OUGH G. S., 1969. Substances extracted during skin contact with white musts, I — General wine composition and quality chances with contact time, *Am. J. Enol. Vitic.*, **20**, 93-100.

PAUL F., 1963. Organoleptique Merkmale unserer Qualitätsweine, *Mitt. Klosterneuburg*, XVIII A, 174-185.

PAUL F., 1970. Eine Systematik der Weine nach organoleptischen Gesichtspunkten, *Mitt. Klosterneuburg*. XX, 112-121.

PERSCHEID M., ZÜRN F., 1976. Uber die Bedeutung des Sauerstoffs bei der Weinbereitung, *Wein Wissenschaft*, **31** (4), 287-299.

RAPP A., LAY H., PAUL F., LEMPERLE E., SCHOBINGER U., JUNGE Ch., JAKOB L., DITTRICH H., 1976. Tagungsbericht zum, *10e Int. Weinchemischen Kolloquium*, 25-27 August, in Graz.

RIBÉREAU-GAYON P. 1975. Les mécanismes de l'oxydation préfermentaire des moûts, *4e Symposium international d'Oenologie*, Valence (Espagne).

SALLER W., 1952. Die gekühlte Gärung, *Mitt. Klosterneuburg*, VI, 223.

SCHAFFER A., 1968. Modalités de la vinification des vins blancs secs sous atmosphère de gaz carbonique, *Ind. Alim. Agric.*, **35**, 12.

VAN VYK C. J., 1975. Apfel-Milchsäuregäring in südafrikanischen Weinen, *4e Symposium Intern. Oenologie*, Valence, 282-292.

WAINWRIGHT T., 1971. The production of H_2S by yeast role of nutrients, *J. Appl. Bact.*, **34**, 161-171.

WÜRDIG G., SCHLOTTER H. A., 1969. Isolierung und Nachweis SO_2 bindender stoffe im Wein, *Wein Wissenschaft*, **24**, 67-82.

ZIMMERMANN H. W., ROSSI E. A. JR., WICK E., 1969. Alcohol losses from entrainment in carbon dioxide evolved during fermentation, *Am. J. Enol. Vitic.*, **19** (2), 63-68.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 231-233

INTERVENTION

Influence du débourbage et de la température de fermentation sur les teneurs en substances volatiles des vins blancs

A. BERTRAND

Institut d'Oenologie,
Université de Bordeaux II (France)

Introduction

En matière de vinification en blanc, il est bien connu que le débourbage et la fermentation à basse température sont des facteurs de la qualité des vins.

Nous nous sommes proposés, à partir de certaines expériences réalisées au laboratoire ou dans la pratique, de rechercher les modifications de la composition chimique des vins entraînées par ces différentes techniques; également la possibilité de relier ces variations aux caractères organoleptiques des vins.

Les dosages des substances volatiles ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse et les descriptions des expériences ont été effectuées par ailleurs.

Les résultats montrent d'abord que le débourbage du moût entraîne une diminution de la somme des alcools supérieurs pouvant aller jusqu'à 42 p. 100; cette variation modifie les caractères organoleptiques des vins; le phényl-2 éthanol, seul alcool supérieur à odeur agréable, varie, dans les mêmes conditions, moins fortement; l'hexanol-1, substance à goût herbacé provenant du raisin, varie dans les mêmes proportions que les autres alcools supérieurs (tabl. 1 et 2). La diminution du taux des alcools supérieurs est probablement liée à la perte de nutriments des levures au cours du débourbage.

Il n'en n'est pas de même en ce qui concerne les esters autres que l'acétate d'éthyle qui possède un métabolisme particulier; ils ont des odeurs fruitées ou florales particulièrement appréciables pour des vins issus de cépages non aromatiques. Les résultats montrent que le débourbage entraîne une augmentation très nette des teneurs en acétates d'isoamyle et de phényl-2 éthyle alors que dans le même temps les alcools correspondants diminuent et que l'acide acétique ne

TABLEAU I

Influence du débourbage du moût et de la présence de SO_2 sur la teneur en substances volatiles des vins blancs. Le débourbage a été effectué statiquement soit à froid, soit à 22 °C, avec ou sans SO_2 (résultats en mg/l, variations en p. 100).

	Témoin non débourbé	Débourbé statiquement à 0 °C		Débourbé statiquement à 22 °C		Variations moyennes dues au débourbage (%)
		sans SO_2	+ 5 g/hl SO_2	+ 5 g/hl SO_2	+ 10 g/hl SO_2	
Hexanol-1	1,42	0,70	0,75	0,76	0,70	— 49
Phényl-2 éthanol	34	23	22	29	19	— 32
Σ des alcools supérieurs	360	202	192	242	199	— 42
Acétate éthyle	21	34	30	28	33	+ 49
Acétate d'isoamyle / Acétate de phényl-2 éthyle	1,69	4,99	4,06	3,63	4,87	+ 160
Σ des autres esters	1,56	2,82	3,04	2,17	3,18	+ 80

TABLEAU 2

Influence du débourbage du moût, du traitement à la bentonite et de la présence de SO_2 sur la teneur en substances volatiles des vins. Moyennes de 3 séries comportant des températures de fermentation différentes (15 °C, 25 °C et 35 °C) (résultats en mg/l, variations en p. 100).

	Témoin non débourbé	Débourbés			Variations dues au débourbage (%)
		SO_2	+ bentonite (100 g/hl)	+ SO_2 (10 g/hl)	
Hexanol-1	7,79	6,94	6,61	5,96	— 17
Phényl-2 éthanol	81,1	66,3	79,7	84,2	— 5
Σ des alcools supérieurs	434	309	334	326	— 26
Acide acétique	234	259	245	211	+ 2
Acétate d'éthyle	65,8	73,2	54,2	46,3	— 12
Acétate d'isoamyle + Acétate de phényl-2 éthyle	2,40	5,03	3,86	4,79	+ 90
Σ des autres esters	4,88	7,16	6,68	5,58	+ 33

varie pratiquement pas. Les autres esters augmentent également mais de façon moins prononcée que les acétates. Il faut donc admettre que le débourbage entraîne de profondes variations dans le métabolisme des levures.

A propos des fermentations à températures variables (tabl. 3), il apparaît de nettes différences entre les produits secondaires. Les alcools supérieurs et les esters, autres que l'acétate d'éthyle, diminuent lorsque la température passe de

TABLEAU 3

Influence de la température de fermentation. Moyennes de 4 séries comportant des conditions différentes (témoin, débourbé, traité à la bentonite, sulfité) (résultats en mg/l, moyennes en p. 100)

	25 °C	15 °C	Variations /25°C (%)	35 °C	Variations /25 °C (%)
Σ des alcools supérieurs . .	353	454	+ 33	246	— 27
Acide acétique	244	71,5	— 68	398	+ 69
Acétate d'éthyle	93,0	54,0	— 37	32,4	+ 37
Acétate d'isoamyle + Acétate de phényl-2 éthyle	3,31	7,74	+ 1,38	1,22	— 62
Σ des autres esters . . .	6,76	7,06	+ 4,4	4,41	— 35

15 à 35 °C. On peut admettre que les plus fortes teneurs observées à basse température sont liées soit à la biosynthèse protéique, soit à la biosynthèse lipidique des levures, forcément plus importante à basse température puisque, dans ces conditions, la masse levurienne est la plus grande. Inversement, l'acide acétique qui n'est pas en relation avec la multiplication cellulaire, mais dépend de l'activité fermentaire, a une teneur croissante avec la température. L'acétate d'éthyle présente un maximum de concentration à 25 °C. Il faut en conclure que sa formation est différente de celle des autres esters.

De manière générale, ces résultats confirment et complètent ceux de DAUDT et OUGH et de WEBB.

En conclusion, le débourbage des moûts de vendange blanche, conçu pour éliminer les particules susceptibles de conférer au vin des odeurs végétales, a pour effet secondaire une modification nette du métabolisme levurien. Il en résulte une diminution des alcools supérieurs et une augmentation des esters autres que l'acétate d'éthyle; dans un cas comme dans l'autre, il s'agit d'éléments favorables à la qualité.

Par ailleurs, une température de fermentation basse entraîne une augmentation des produits secondaires de la fermentation, en général, également favorable à la qualité des vins.

Ces observations expliquent les résultats de la pratique : les meilleurs vins blancs sont obtenus après débourbage et fermentation à basse température.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 235-237

INTERVENTION

Influence de la teinte du verre sur l'évolution du vin en bouteilles

J. G. OTT

Antibes (France)

Introduction

On a souvent observé des variations de goût et de bouquet dans des bouteilles de vin rouge, à l'issue d'une certaine période de conservation. Bien entendu on accuse d'abord le bouchon; mais on se demande ensuite si la teinte du verre, plus particulièrement sa capacité d'absorption du rayonnement ultraviolet, n'a pas aussi une action sur le vin.

Intuitivement, on pense que les teintes foncées sont les plus favorables à la conservation et au bon vieillissement du vin. Nos observations personnelles confirment cette appréciation; d'une manière générale, les teintes à reflets bleus, verts-bleus, également les teintes claires donnent des vins moins agréables que les teintes foncées. D'ailleurs quand on a la chance de déguster une bouteille d'un grand vin rouge de Bordeaux d'une cinquantaine d'années on est surpris de la teinte marron fumé du verre utilisé; également les très vieilles bouteilles de champagne étaient beaucoup plus foncées.

Or actuellement, ce sont justement des teintes de plus en plus claires que les fabricants français de verre mettent à la disposition des professionnels.

Il était donc intéressant de disposer d'une méthode physique permettant de définir les caractéristiques spectrales des différents verres utilisés pour la conservation des vins. A notre connaissance une telle étude n'avait jamais été faite dans le cas du vin; par contre il existe de nombreux résultats dans le cas de la bière. Nous avons réalisé cette étude sur 49 verres différents; les résultats montrent les différences spectrales significatives de ces échantillons, par conséquent l'importance de cette question un peu trop négligée jusqu'à maintenant.

Mais il faut aussi pouvoir établir une relation entre les caractéristiques spectrales des verres et le comportement du vin, c'est-à-dire définir les qualités des

différentes fabrications pour la conservation des vins. Différents essais préliminaires ont été faits dans ce sens; mais nous prévoyons une mise en bouteille expérimentale complète, avec des bouteilles d'origines variées et de teintes diverses, qui seront ensuite stockées dans des conditions différentes de rayonnement (soleil et éclairage artificiel).

Incidence du verre sur le vin

Parmi les différentes actions que peut avoir le verre sur le vin, nous avons étudié l'influence du rayonnement qui le traverse. Une étude complète sera publiée dans la revue française d'Oenologie. Deux séries de déterminations de spectres ont été faites, à l'Université de Nice, avec un spectrophotomètre Spectralux Safas d'une part, un appareil Carry 118 C d'autre part. Les graphiques des spectres sont différents dans les deux cas, mais il est possible d'établir une correspondance entre les deux techniques.

49 échantillons de verre ont été découpés dans des bouteilles d'origine, de couleur et de qualité différentes; certaines ne sont pas des bouteilles de vin. Les spectres ont été tracés entre 300 et 850 nm; en dessous de 300 nm tous les verres sont opaques.

Différents verres ont des spectres voisins, mais on observe aussi des différences sensibles dans certains cas, particulièrement dans l'ultraviolet. Or des premières observations, portant sur la comparaison simultanée de la dégustation du vin et du spectre de la bouteille, indiquent une bonne corrélation; les vins conservés dans des bouteilles opaques aux U.V. sont trouvés plus agréables; par contre les vins qui paraissent avoir vieilli trop vite sont dans des verres transparents aux U.V. et même au violet. Il apparaît donc nécessaire d'approfondir l'examen des 49 spectres pour préciser les longueurs d'onde limite de pénétration des U.V.; il serait intéressant d'étudier une éventuelle action des infrarouges.

Premières conclusions

Il ne faudrait pas conclure, à ce stade de mes observations, qu'il faut opter, pour les vins rouges, pour des verres le plus opaque possible aux ultraviolets et au violet. Il faudra attendre les résultats de l'expérience du vieillissement d'un même vin rouge dans diverses teintes de verre et exposées à la lumière, comme dans les étalages des magasins (soleil et éclairage). Il faudra aussi voir si la large pénétration des infrarouges, souhaitée par les verriers est favorable à la bonne évolution du vin.

Il reste à faire l'étude expérimentale d'une mise en bouteille simultanée dans les verres de différentes teintes rassemblés à cet effet; mais d'ores et déjà on pourra faire des comparaisons sur des mises faites en 1950, 1953 et 1964 avec des verres de deux teintes différentes (feuille morte et vert bleu). On pourra aussi faire une comparaison sur un vin blanc de Provence embouteillé en 1973 avec cinq teintes de verre différentes. Mais on sait déjà que le vin blanc sera trouvé meilleur dans les teintes foncées que dans le verre blanc. Pour le rosé, qui gagne en esthétique à être servi dans du verre blanc, il n'est pas exclu d'obtenir bientôt un verre blanc, ou pratiquement blanc qui arrête suffisamment les U.V. pour en améliorer la

conservation. Il y a même déjà des études entreprises pour des revêtements externes des bouteilles et des traitements de surface.

Les producteurs de vin et les œnologues qui les conseillent souhaitent maintenant parvenir à un dialogue efficace avec les verriers, afin d'obtenir des verres de bouteille les plus favorables à la conservation des vins. Il est regrettable de penser que d'excellents crus puissent être victimes d'une altération au cours de leur manipulation et de leur stockage par suite d'exposition à la lumière, alors que la qualité du verre aurait pu l'éviter, ou tout au moins le limiter.

Si les verriers sentent que nous sommes décidés à nous unir pour exiger la même qualité de verre en une période de l'année, même pour faire des bouteilles de formes diverses, ils seront d'accord pour consacrer un de leurs fours et nous donner satisfaction.

De notre côté, si nous sommes informés des difficultés techniques des verriers nous serions sans doute d'accord pour supporter quelques centimes supplémentaires afin de disposer d'un verre de qualité et satisfaire notre client. A quoi sert-il de faire un vin de cru, s'il s'altère avant d'arriver sur la table ?

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 239-252

Évolution de la couleur des vins au cours de leur conservation et de leur vieillissement

G. MARGHERI

Istituto Agrario Provinciale San Michele all'Adige, Trento (Italia)

Résumé

Une nouvelle méthode de fractionnement des composés polyphénoliques des vins rouges est proposée afin de déterminer l'apport des tanins et des anthocyanes à la couleur de ces vins au cours de leur conservation et de leur vieillissement. Les tanins totaux ont été précipités par le sulfate de cinchonine et les tanins à un haut degré de polymérisation par le chlorure de sodium; les composés phénoliques à faible degré de polymérisation ont été extraits par l'acétate d'éthyle. Sur les diverses fractions, les réactions physico-chimiques caractéristiques des groupes fonctionnels des polyphénols ont été ensuite appliquées.

L'examen de six vins provenant de 4 régions viticoles typiques d'Italie et d'un vin de presse a montré des différences remarquables tant du point de vue de la qualité qu'à celui de la quantité des composés polyphénoliques. Il en résulte que chaque vin possède sa propre richesse caractéristique en constituants polyphénoliques.

L'auteur a montré aussi que dans certains vins jeunes tel le *Marzemino*, les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans l'intensité colorante du vin, alors que pour d'autres vins (le *Nebbiolo* et le *Primitivo*) c'est le rôle des tanins qui est plus important. Au cours du vieillissement du vin il se produit une diminution des anthocyanes et une polymérisation des leucoanthocyanes : ce qui montre le rôle prépondérant des tanins dans l'intensité de la couleur des vins vieux.

Mots clés : *Vins Rouges — Couleur — Polyphénols — Fractionnement — Tanins — Anthocyanes — Conservation — Vieillissement.*

Introduction

Depuis vingt ans, d'importants résultats, tant théoriques que pratiques ont été obtenus à l'Institut d'Oenologie de Bordeaux dans le domaine de la couleur des vins rouges. Ribéreau-Gayon (1959, 1973), Stonestreet (1965) et Glories (1971, 1974) ont montré que les composés phénoliques des vins rouges sont essentiellement constitués par un mélange de tanins et d'anthocyanes, qui, avec les

acides, sont parmi les constituants les plus importants du vin. En effet, les qualités organoleptiques des vins rouges, couleur, saveur et, en partie bouquet, dépendent essentiellement de leur composition qualitative et quantitative en composés polyphénoliques.

Celle-ci varie avec les cépages, la maturation du raisin, la technologie de préparation du moût, les techniques de fermentation (SUDRAUD, 1963; SINGLETON et ESAU, 1969; POUX et AUBERT, 1969; RIBÉREAU-GAYON, 1972; BOURZEIX et SAQUET, 1975).

Pour une même composition du raisin, il est incontestable que les deux derniers facteurs déterminent les différences les plus importantes dans la composition polyphénolique des vins.

On connaît depuis longtemps la nature chimique des pigments rouges ou anthocyanes (RIBÉREAU-GAYON 1959, 1968), des raisins qui se retrouvent au moins partiellement dans le vin après vinification et qui participent à sa coloration. Les tanins du vin sont constitués par un mélange de polymères de flavanes (leucoanthocyanes et catéchines) plus ou moins condensés et appelés flavolanes. Leur masse moléculaire est comprise entre 600 et 3 000; leur structure varie suivant l'âge et leur état physicochimique dans le vin.

GLORIES (1971) a montré que dans les vins rouges jeunes, la masse moléculaire moyenne des tanins est de l'ordre de 1 000 alors qu'elle est de 3 000 dans les vins vieux.

Bien qu'on sache à présent que les molécules de leucoanthocyanes jouent un rôle plus important que celui des catéchines, la structure des oligomères n'a pas encore été bien élucidée.

RIBÉREAU-GAYON, 1973, souligne le fait que les anthocyanes isolées ont une coloration rose-violet très différente de celle du vin, que les tanins isolés sont colorés en jaune et que, par contre, le mélange tanin-anthocyanes, en milieu synthétique de même composition que le vin, acquiert une couleur rouge vif, identique à la couleur du vin jeune.

Selon SUDRAUD (1958, 1963) la teinte de la coloration représente la proportion de couleur jaune par rapport à la couleur rouge et l'intensité correspond à la somme de ces deux couleurs élémentaires.

Dès 1973, RIBEREAU-GAYON, considérant les processus de transformation des anthocyanes dans le vin rouge, remarquait que certains facteurs modifient la couleur des anthocyanes de façon réversible alors que d'autres en entraînent une destruction irréversible.

Les trois principaux facteurs de la disparition des anthocyanes au cours de la conservation et du vieillissement du vin sont l'oxydation des anthocyanes, l'hydrolyse des anthocyanosides en aglycones correspondants conduisant à la formation de particules colloïdales assez grosses pour provoquer la précipitation (BERG, 1963); enfin et, plus vraisemblablement, la combinaison des anthocyanes avec les tanins en présence d'éthanal, substance qui selon SOMERS (1971) et TIMBERLAKE et BRIDLE (1976) en accélère la polymérisation; les tanins subissent en même temps une condensation oxydative qui est déterminante pour la modification de la couleur des vins vieux; ceux-ci prennent une teinte orangé-tuilé (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1965, 1966; SINGLETON et ESAU, 1969; SOMERS, 1971).

Des travaux récents (JURD et SOMERS, 1970; RIBÉREAU-GAYON, 1973; MICHAUD et MASQUELIER, 1973) permettent d'attribuer un rôle important aux tanins catéchiques, dans ce phénomène qui semble lié à la formation de pigments jaunes dérivés du xanthylium.

L'étude des anthocyanes et des tanins reste insuffisante pour interpréter

l'intensité de la coloration du vin. JURD (1967, 1969) a montré la possibilité d'intervention dans la polymérisation des flavanes, des molécules d'anthocyanes.

A ce sujet, les résultats relatifs à la copolymérisation anthocyanes-flavonoïdes et à ses conséquences sur la couleur du vin au cours de sa conservation ont été résumés par SINGLETON et ESAU (1969).

Au cours de la conservation et du vieillissement du vin, SOMERS (1971) a envisagé la formation d'un véritable pigment à la suite d'une réaction de copolymérisation entre molécules d'anthocyanes et de flavanes constitutives des tanins condensés : dans ce pigment, la molécule d'anthocyane, toujours sous sa forme flavylium ne réagirait plus avec l'anhydride sulfureux. La nature de ce pigment a été étudiée en 1973 par RIBEREAU-GAYON. Les tanins et les anthocyanes jouent donc un rôle prépondérant dans les modifications de la couleur du vin au cours de sa conservation et de son vieillissement.

C'est pourquoi la connaissance de la structure et des propriétés physico-chimiques des composés polyphénoliques des vins rouges permet d'intervenir dans les techniques de vinification de conservation pour obtenir des vins de qualité, d'une parfaite conservation et d'un vieillissement optimum.

On ne pourra trouver de solution satisfaisante au problème des composés phénoliques que lorsqu'on sera en mesure de séparer et de doser individuellement les molécules à différents degrés de polymérisation tout en évitant de modifier les équilibres entre les composés phénoliques du vin.

D'après RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966), MICHAUD et MASQUELIER (1973), les flavanes du raisin et du vin se classent en quatre catégories relativement arbitraires suivant leurs propriétés physico-chimiques et organoleptiques correspondant à différents degrés de polymérisation, allant de 1 à plus de 10 molécules élémentaires.

MASQUELIER *et al.* (1959) ont réussi à éliminer, par addition d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, les composés phénoliques les plus condensés du vin, ceux dont le degré de polymérisation est compris entre l'hexamère et le décamère : ils ont également montré que la précipitation des polymères exige l'absence totale d'alcool dans le milieu. Par centrifugation le précipité a été séparé du liquide surnageant dont on a extrait par l'acétate d'éthyle, les formes faiblement polymérisées; à partir d'un extrait végétal, PERI et POMPEI (1971), s'inspirant du mode opératoire de BRUGIRARD et TAVERNIER (1952), sont parvenus à séparer les composés polyphénoliques non-tanins des composés tanins-vrais après précipitation de ces derniers par le sulfate de cinchonine.

Étude expérimentale

Nos recherches personnelles ont tendu à la caractérisation des vins en fractionnant leurs composés polyphénoliques selon des modes opératoires simples.

Ce fractionnement est réalisé par l'emploi du chlorure de sodium, du sulfate de cinchonine et de l'acétate d'éthyle; on soumet les diverses fractions aux réactions caractéristiques des groupements fonctionnels des polyphénols.

Nous avons étudié différents vins obtenus par vinification traditionnelle de divers cépages issus de quatre régions viticoles caractéristiques d'Italie.

Les résultats, rassemblés dans les tableaux 1 à 7, montrent que les sept vins présentent des différences remarquables, tant qualitatives que quantitatives, dans leurs teneurs en diverses fractions polyphénoliques.

TABLEAU I

Influence de quelques traitements sur la composition en polyphénols d'un vin de Nebbiolo 1975 (1) (intensité colorante 0,87) et d'un vin de Primitivo 1975, (2) (intensité colorante 1,33)

(Analyses effectuées en mars-avril 1976)

	Polyphénols totaux Folin Ciocalteu (mg/l catéchine)		Réaction à la Vanilline (V) (mg/l catéchine)		L A (mg/l de cyanidine)		Anthocyanes (mg/l de cyanidine)	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Témoin	2 960	3 000	1 202	867	2 293	2 373	136	186
Après traitement par le sulfate de cinchonine	1 056	1 312	378	256	553	704	36	52
Après traitement par le chlorure de sodium	2 440	2 200	910	572	1 509	1 437	91	102
Extrait par l'acétate d'éthyle. . .	624	472	236	70	243	99	—	—

Vins de cépages différents

Le tableau 1 montre en effet, que l'intensité de la couleur du vin de *Nebbiolo* (0,87) est très différente de celle du vin de *Primitivo* (1,33) même si les teneurs en SO_2 et les valeurs du pH de ces deux vins sont identiques; ces deux vins ont la même teneur en polyphénols totaux (2 960-3 000) et les mêmes teneurs en leucoanthocyanes (2 293-2 373). Le vin de *Nebbiolo* n'a que 50 mg d'anthocyanes par litre de moins que le vin de *Primitivo;* ils sont cependant très différents par leurs teneurs en polyphénols réagissant avec la vanilline. Le rapport V/LA (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1966) est de 0,5 pour le *Nebbiolo* et de 0,36 pour le *Primitivo*. C'est donc que la proportion de tanins fortement polymérisés est très supérieure dans le vin de *Primitivo;* ceci est confirmé par le fait que la quantité de flavanes faiblement polymérisées extraite par l'acétate d'éthyle et réagissant avec la vanilline représente 20 p. 100 des polyphénols totaux réagissant avec la vanilline pour le vin de *Nebbiolo* et seulement 8 p. 100 pour le vin de *Primitivo*.

Dans le même extrait, après précipitation des tanins par addition de sulfate de cinchonine, il reste dans les vins 62 à 25 p. 100 de polyphénols réagissant avec la vanilline. Il en est de même en ce qui concerne la comparaison des teneurs en leucoanthocyanes faiblement polymérisés et extraits par l'acétate d'éthyle.

On note en outre dans le tableau 1 que ce solvant extrait 10,5 p. 100 des leucoanthocyanes totaux du vin de *Nebbiolo* et seulement 4 p. 100 de ceux du vin de *Primitivo;* dans le même extrait 44 et 25 p. 100 des leucoanthocyanes restent dans le vin après précipitation des tanins par le sulfate de cinchonine; cela prouve que dans ces deux vins les tanins, tout en étant constitués par des polymères de flavolanes diversement polymérisés, ont un rôle prépondérant sur l'intensité de la couleur.

Vins de même cépage

Les deux vins de *Marzemino* (tabl. 2) identiques en ce qui concerne le pH et la teneur en SO_2, ont également la même teneur en anthocyanes; cependant, leurs teneurs en leucoanthocyanes et en tanins totaux sont très différentes; le vin de *Marzemino 2* a deux fois plus de leucoanthocyanes totaux que le *Marzemino 1*. Dans ces deux vins les tanins sont constitués en grande partie de composés faiblement polymérisés mais avec des taux très différents : en effet, le chlorure de sodium n'a précipité que 6 p. 100 de la teneur en leucoanthocyanes totaux du *Marzemino 1* contre 23 p. 100 pour le *Marzemino 2;* ceci montre que les tanins de ce deuxième vin sont constitués de polymères plus importants que ceux du *Marzemino 1*.

Après traitement par le sulfate de cinchonine, il reste 62 p. 100 des leucoanthocyanes totaux dans le vin de *Marzemino 1* contre 45 p. 100 dans le *Marzemino 2*.

On note dans le tableau 2 que si pour le *Marzemino 2* la teneur en leucoanthocyanes de l'extrait à l'acétate d'éthyle est de 66 p. 100, il ne reste plus dans le *Marzemino 1* que 50 p. 100 de leucoanthocyanes après précipitation des tanins par le sulfate de cinchonine.

Le rôle des tanins dans l'intensité de la couleur de ces deux vins n'est donc pas tellement déterminant contrairement à celui des anthocyanes qui est primordial : ceci est confirmé par le fait que les anthocyanidines subissent une décoloration immédiate et totale par addition d'un excès d'anhydride sulfureux au pH du vin (Somers et Evan, 1974).

TABLEAU 2

Influence de quelques traitements sur la composition polyphénolique des vins de Marzemino de 1976
(1) *Intensité colorante 0,56,* (2) *Intensité colorante 0,72*)
(Analyses effectuées en décembre 1976)

	Polyphénols totaux Folin ciocalteu (mg /l catéchine)		Réaction à la Vanilline (V) (mg /l catéchine)		L A (mg /l cyanidine)		Anthocyanes (mg /l cyanidine)	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2
Témoin	1 140	1 680	247	482	342	685	285	308
Après traitement par le sulfate de cinchonine	800	1 008	198	288	210	312	233	242
Après traitement par le chlorure de sodium	960	1 200	225	360	320	462	229	192
Extrait par l'acétate d'éthyle. . .	400	536	159	247	115	200	—	—

On peut en outre constater (tabl. 2) qu'après traitement par le chlorure de sodium, il reste 80 p. 100 d'anthocyanes dans le *Marzemino 1* et seulement 62 p. 100 dans le *Marzemino 2* ; ceci montre que dans les deux cas les anthocyanes se trouvent sous des formes physico-chimiques très différentes; ces deux vins ayant des composés phénoliques labiles, c'est-à-dire peu polymérisés vieillissent rapidement et supportent mal une conservation prolongée.

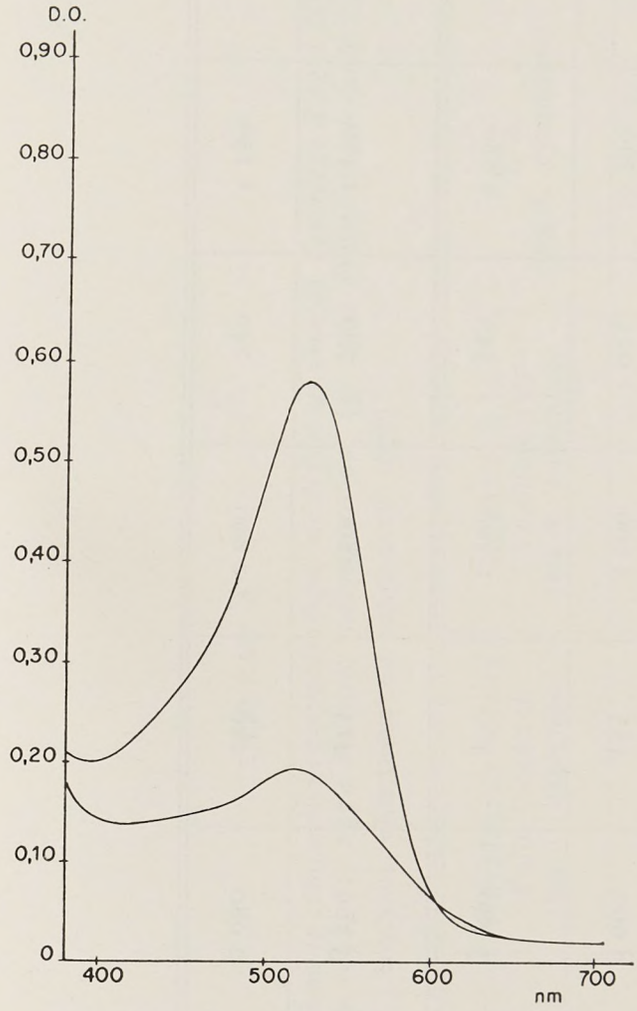


FIG. 1.

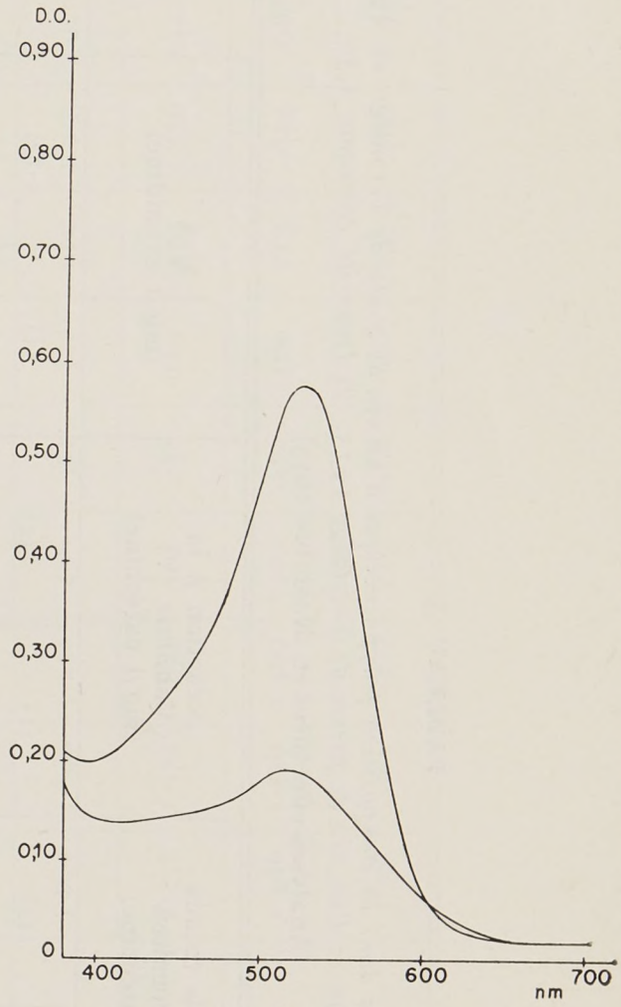


FIG. 2.

FIG. 1. — *Spectre d'absorption sur 1 mm d'épaisseur d'un vin de Marzemino 1 avant et après le traitement au métabisulfite de sodium*

FIG. 2. — *Spectre d'absorption sur 1 mm d'épaisseur d'un vin de Marzemino 2 avant et après traitement au métabisulfite de sodium.*

La comparaison du tableau 3 montre que le mode de fractionnement des polyphénols que nous avons proposé permet de distinguer aisément un vin de goutte d'un vin de presse.

Vins de presse et de goutte

Le vin de presse a une teneur en composés phénoliques très polymérisés de 61 p. 100 alors que le vin de goutte en contient seulement 26 p. 100.

Les anthocyanes précipitent également presque totalement (74 p. 100) quand le vin de presse est traité par le chlorure de sodium; dans ce cas, 73 p. 100 des antho-

TABLEAU 3

Influence de quelques traitements dans la composition polyphénolique d'un vin de goutte de Teroldego de 1975
(1) *Intensité colorante 0,92 et d'un vin de presse de Teroldego 1975,* (2) *Intensité colorante 1,50*
(Analyses effectuées en décembre 1975)

	Polyphénols totaux Folin Ciocalteu (mg/l catéchine)		Réaction à la Vanilline (V) (mg/l catéchine)		L A (mg/l cyanidine)		Anthocyanes (mg/l cyanidine)	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Témoin	1 890	8 000	455	3 600	1 025	6 760	410	437
Après traitement par le sulfate de cinchonine	1 192	3 280	300	1 260	545	1 880	312	188
Après traitement par le chlorure de sodium	1 860	3 760	415	1 800	760	2 460	300	104
Extrait par l'acétate d'éthyle. . .	550	2 080	220	1 090	240	1 150	—	—

TABLEAU 4

Influence de quelques traitements dans la composition polyphénolique de différents vins de Teroldego d'âges différents
(1) *1975 Intensité colorante 0,91*, (2) *1974 Intensité colorante 0,62*, (3) *1961 Intensité colorante 0,80*
(Analyses effectuées en mars-avril 1976)

	Polyphénols totaux Folin Ciocalteu (mg/l catéchine)			Réaction à la Vanilline (V) (mg/l catéchine)			L A (mg/l cyanidine)			Anthocyanes (mg/l cyanidine)		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Témoin	1 670	1 840	2 240	430	382	310	912	1 055	1 220	380	127	35
Après traitement par le sulfate de cinchonine	1 136	1 072	832	301	238	119	579	576	440	312	68	12
Après traitement par le chlorure de sodium	1 480	1 420	1 460	400	270	160	713	844	688	265	68	20
Extrait par l'acétate d'éthyle	600	484	360	230	168	60	222	166	75	—	—	—

cyanes du vin de goutte restent dans le vin; comme précédemment, ceci montre que les anthocyanes du vin de presse sont sous un état très différent de celui des anthocyanes du vin de goutte.

Vins d'âges différents

Le même mode de fractionnement a été adopté pour l'étude de l'intervention des anthocyanes et des tanins sur la coloration du vin au cours de sa conservation et de son vieillissement. Nous avons analysé 10 vins provenant du même vignoble, de 10 millésimes différents entre 1961 et 1975. Ces vins sont issus de vinifications

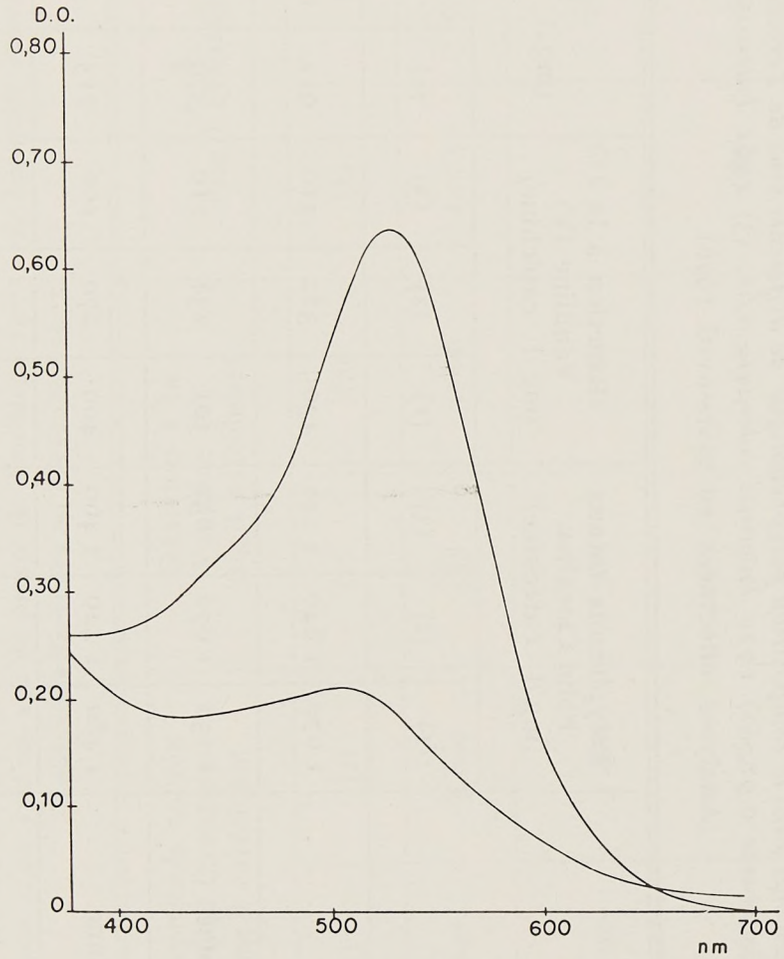


FIG. 3. — *Spectre d'absorption sur 1 mm d'épaisseur d'un vin de Teroldego 1975 avant et après traitement au métabisulfite de sodium.*

traditionnelles, effectuées dans la même cave, avec des raisins de *Teroldego* provenant de la même zone de production. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4. Les analyses effectuées en décembre 1975 sur le vin de la vendange 1975 montrent que 78 p. 100 des leucoanthocyanes totaux, 93 p. 100 des polyphénols réagissant avec la vanilline et 69 p. 100 des anthocyanes restent dans le vin après traitement par le chlorure de sodium. L'acétate d'éthyle extrait 24 p. 100 des leucoanthocyanes totaux et 53 p. 100 des polyphénols réagissant avec la vanilline; ces résultats sont l'indication d'un faible degré de polymérisation des tanins, ainsi peu colorés; on en déduit que les anthocyanes doivent jouer un rôle important dans la coloration du vin de *Teroldego*.

Le pourcentage des tanins précipités par le chlorure de sodium reste sensible-

ment constant; il s'est donc produit, pendant la conservation, une polymérisation des anthocyanes, formes insolubles dans une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. L'état physico-chimique des molécules d'anthocyanes a donc subi une modification.

Le vin de *Teroldego* 1974 (tabl. 4) après 18 mois de vieillissement ne contient plus que 127 mg par l d'anthocyanes. Le chlorure de sodium et le sulfate de cinchonine en ont fait précipiter la même quantité, près de 50 p. 100.

La fraction des leucoanthocyanes extraite par l'acétate d'éthyle est très faible puisqu'elle ne représente que 16 p. 100 des leucoanthocyanes totaux; au cours du vieillissement, une modification continue de l'état physico-chimique des anthocyanes se produit parallèlement à une diminution des formes monomères ou faible-

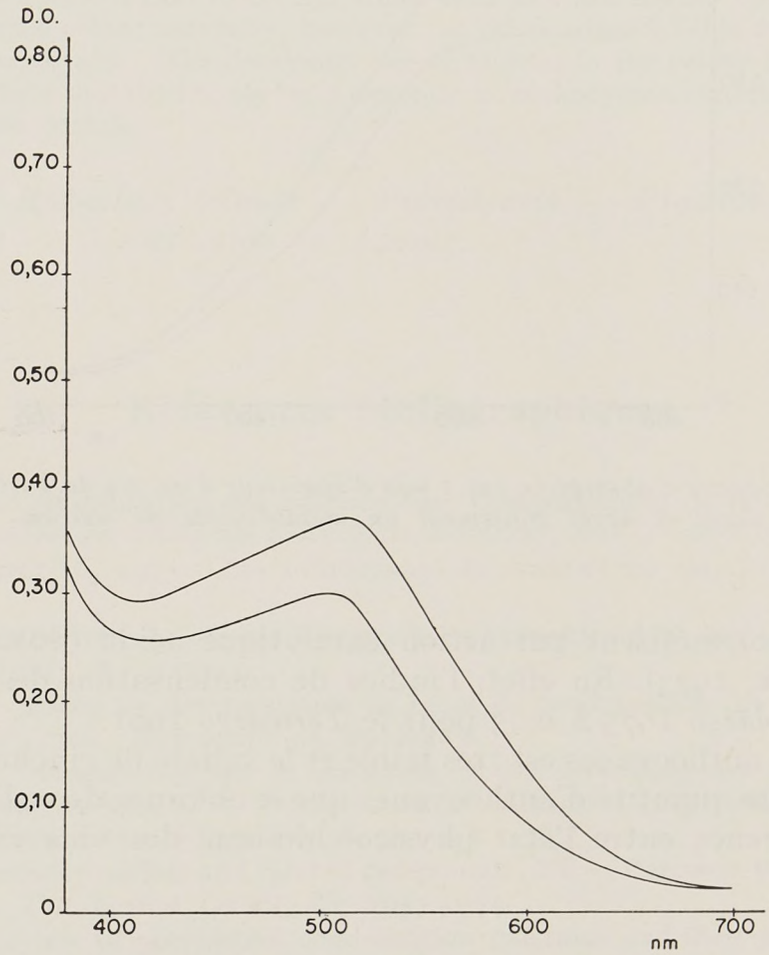


FIG. 4. — *Spectre d'absorption sur 1 mm d'épaisseur d'un vin de Teroldego 1971 avant et après traitement au métabisulfite de sodium.*

ment polymérisées des leucoanthocyanes, ce qui provoque une augmentation de leur degré de polymérisation.

D'après l'analyse du vin de *Teroldego* 1961 (tabl. 4) le phénomène de polymérisation des leucoanthocyanes apparaît encore plus clairement : en effet, le chlorure de sodium entraîne la précipitation de 44 p. 100 des leucoanthocyanes totaux et de 50 p. 100 des polyphénols réagissant avec la vanilline; avec le sulfate de cinchonine, la précipitation est de 64 p. 100 des leucoanthocyanes totaux et de 62 p. 100 des polyphénols réagissant avec la vanilline.

La teneur en leucoanthocyanes et en polyphénols réagissant avec la vanilline et extraits par l'acétate d'éthyle est très faible (respectivement 6,1 à 20 p. 100) ce qui explique l'augmentation du degré de polymérisation des tanins puisque

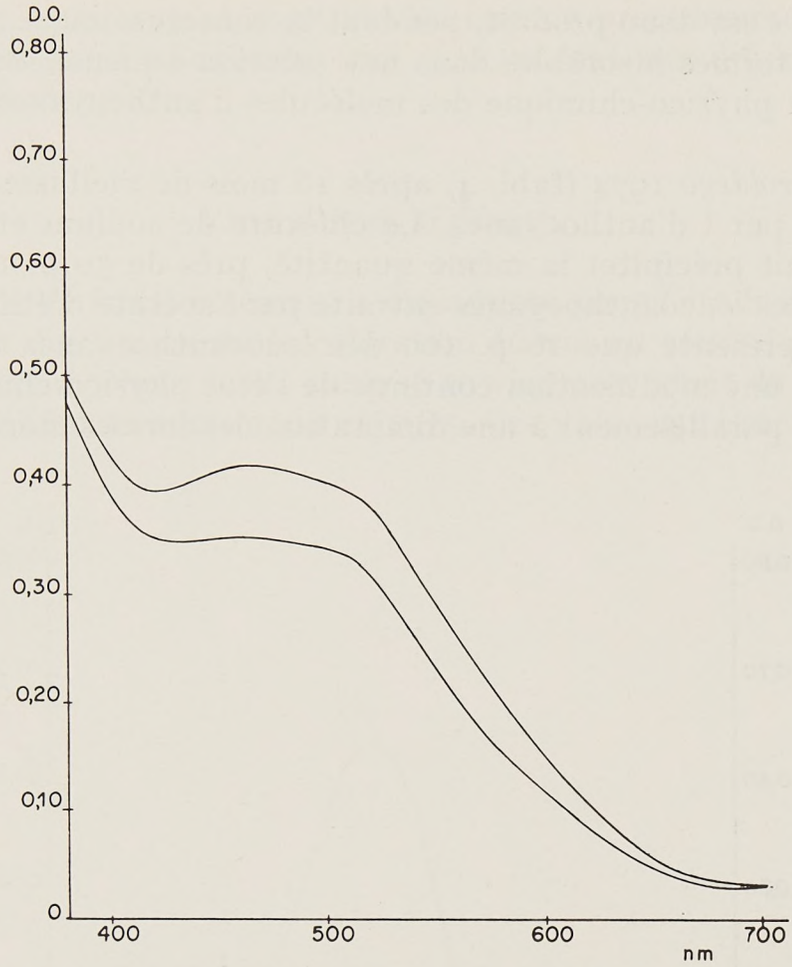


FIG. 5. — *Spectre d'absorption sur 1 mm d'épaisseur d'un vin de Teroldego 1961 avant et après traitement au métabisulfite de sodium.*

les flavanes se polymérisent par action catalytique acide (SOMERS, 1975, 1976; RIBÉREAU-GAYON, 1973). En effet, l'indice de condensation des tanins passe de 0,47 pour le *Teroldego* 1975 à 0,23 pour le *Teroldego* 1961.

La teneur en anthocyanes est très faible et le sulfate de cinchonine a fait précipiter une plus forte quantité d'anthocyanes que le chlorure de sodium. Ceci montre une grande différence entre l'état physico-chimique des vins vieux et celui des vins jeunes.

Conclusion

Nous avons donc constaté que les anthocyanes disparaissent rapidement au cours de la conservation et du vieillissement du vin et que, finalement, ce sont les tanins qui jouent le rôle le plus important dans la couleur orange tuilée du vin vieux. Notre méthode de fractionnement nous a permis de montrer une fois encore que la théorie de la condensation des tanins en fonction du temps (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966; GLORIES, 1971) est un fait indiscutable.

Nous pouvons donc conclure que pour caractériser les composés phénoliques des vins rouges et pour étudier leur évolution au cours de la conservation et du vieillissement, le mode de fractionnement que nous avons proposé est une technique valable bien que nous poursuivions nos recherches en vue d'améliorations ultérieures.

Summary

Evolution of the wine colour during conservation and ageing

A new method of fractionating polyphenols of red wines in order to determine the contribution of tannins and anthocyanins to wine colour during conservation and ageing is proposed. The tannins in totality are precipitated by cinchonine sulphate and highly polymerised tannins by sodium chloride. Slightly polymerised phenols are extracted by ethyl acetate. Characteristic functional group reactions of the polyphenols are then employed for these different fractions.

The study of six wines from 4 typical Italian viticultural regions and one highly pressed wine showed remarkable differences in terms of quality as well as quantity of the polyphenols. The result is that each wine has its own characteristic content of polyphenols.

It has also been shown that in certain wines such as « *Marzemino* » anthocyanins play the dominant role in wine colour intensity, however for other wines (*Nebbiolo* and *Primitivo*) the tannins are more important. The dominant role of tannins in the colour intensity of old wines is indicated by the fact that during ageing a decrease in anthocyanin content and polymerisation of leucoanthocyanins occurs.

Key-words: *Red-wines colours — Polyphenols — Fractionating — Tannins — Anthocyanins — Conservation — Ageing.*

Références bibliographiques

BERG H. W., 1963. Stabilisation des anthocyanes. Comportement de la couleur dans les vins rouges, *1er Symposium International d'Œnologie, Bordeaux, Ann. Technol. Agric.*, **12**, 247-259.

BOURZEIX M., SAQUET H., 1975. Les anthocyanes du raisin et du vin, *Vignes et Vins, numéro spécial*, 1-28.

BRUGIRARD A., .TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes dans les Cidres et les Poirés, *Ann. Technol Agric.*, **3**, 311-343.

GLORIES Y., 1971. Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge, *Thèse doctorat, 3e cycle*, Université de Bordeaux.

GLORIES Y., 1974. Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges, II — Précipitation et extraction en présence de sels minéraux. Action des protéines, *Conn. Vigne Vin*, **8**, 375-393.

JURD L., 1967. Anthocyanidins and related compounds. XI — Catechin flavylium salt condensation reactions, *Tetrahedron Lettres*, **23**, 1057-1064.

JURD L., 1969. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the ageing of wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, **20**, 191-195.

JURD L. et SOMERS T. C., 1970. The formation of Xanthylium salts from proanthocyanidins, *Phytochem.*, **9**, 419-427.

MASQUELIER J., VITTE G., ORTEGA M., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145-148.

MICHAUD J., MASQUELIER J., 1973. Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tanins catéchiques, leurs relations avec la vitamine C_2 (P), *Prod. et Prob. Pharm.*, **28** (7).

PERI C., POMPEI C., 1971. Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts, *Phytochem.*, **10**, 2187-2189.

PERI C., POMPEI C., 1971. An assay of different phenolic fractions in wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, **22**, 55-58.

POUX C., AUBERT S., 1968. Corrélation entre la constitution en composés phénoliques des vins, la température de vinification et les caractéristiques générales de l'année, *Ann. Technol. Agric.*, **17**, 299-313.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*, Libr. Gen. Enseignement, Paris, p. 106.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p. 254.

RIBEREAU-GAYON P., 1972. Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin, II — Discussion des résultats obtenus en 1969, 1970 et 1971, *Conn. Vigne Vin*, **6**, 161-175.

RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges, *Vitis*, **12**, 119-142.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge, *Bull. Soc. Chim. France*, **9**, 2649-2652.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure, *Chim. Anal.*, **48**, 188-196.

SINGLETON V. L. et ESAU P., 1969. Phenolic substances in grapes and wine and their significance, Academic Press; New York.

SOMERS T. C., 1971. The polymeric nature of wine pigments, *Phytochem.*, **10**, 2175-2186.

SOMERS T. C., 1975. In Search of quality for red wines *Food Technol. Australia*, **27** (2), 49-56.

SOMERS T. C., 1976. Pigment development during ripening of the grape, *Vitis*, **14**, 269-277.

SOMERS T. C., EVAN M. E., 1974. Wine quality: correlation with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines, *J. Sc. Agric.*, **25**, 1369-1379.

STONESTREET E., 1965. Contribution à l'étude des tanins et de la matière colorante des vins rouges, *Thèse de doctorat 3e cycle*, Bordeaux, p. 77.

SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Techn. Agric.*, **7**, 203-208.

SUDRAUD P., 1963. Étude expérimentale de la vinification en rouge. *Symposium International d'Œnologie, Bordeaux. Ann. Technol. Agric., n° spécial.*

TIMBERLAKE C. F., BRIDLE P., 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, 97-105.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 253-255

INTERVENTION

Caractérisation des différentes fractions constitutives des composés phénoliques du vin rouge, Leurs propriétés œnologiques

Y. GLORIES

Institut d'Oenologie,
Université de Bordeaux II (France)

Parmi les composés phénoliques du vin rouge, les tanins et les anthocyanes jouent le rôle le plus important au niveau de la couleur et des propriétés organoleptiques.

On sait aujourd'hui que les tanins du raisin et du vin sont constitués d'un mélange de molécules de flavanes plus ou moins polymérisées appelées proanthocyanidines condensées à la place du terme de flavolanes précédemment utilisé et que les anthocyanes existent dans le vin sous forme libre et combinée avec les tanins.

Les procyanidines dimères ont été largement étudiées mais peu de travaux concernent les procyanidines condensées en raison de la difficulté du fractionnement de ces molécules. L'étude de la structure est un point très important; les propriétés de ce groupe de molécules sont sous la dépendance de leur état de condensation.

Les méthodes classiques de fractionnement et d'isolement étant insuffisantes, il nous a paru indispensable de mettre au point une méthode générale permettant l'étude à partir du vin des différentes fractions de tanins et d'anthocyanes.

Cette méthode est une combinaison de différentes techniques, elle comprend :

— La précipitation du vin par l'éthanol pour éliminer les complexes tanins-polysaccharides.

— La précipitation du surnageant précédent par le couple Méthanol-chloroforme pour séparer les molécules condensées.

— La fixation du surnageant et du précipité sur la pvp.

— L'élution sélective des différents composés par l'eau, les solvants hydro-alcooliques et l'acide formique.

Les fractions isolées du vin sont étudiées par chromatographie sur papier, couche mince de cellulose, spectroscopie visible — U.V., I.R., R.M.N. et par l'analyse organique élémentaire. Les groupes suivants ont été identifiés :

— Les anthocyanes libres (Al) qui sont constituées dans le vin jeune d'anthocyanines monoglucosides et acylées.

— Le groupe des procyanidines peu condensées et des catéchines (P + C), qui sont des flavanols purs.

— Les complexes tanins-anthocyanes (T.A) dont la masse moléculaire est comprise entre 1 000 et 2 000 qui correspondent à la combinaison de flavanols, d'anthocyanes et de sels.

— Les tanins peu condensés (T), dont la masse moléculaire est comprise entre 1 000 et 2 000 correspondent à la combinaison de flavanols, d'anthocyanines dégradées et de sels.

— Le groupe des tanins condensés qui se divise en tanins condensés (TC). dont la masse moléculaire est comprise entre 2 000 et 3 000 et en tanins très condensés (TtC) dont la masse moléculaire est comprise entre 3 000 et 5 000. Ce sont des combinaisons complexes avec les flavanols, les anthocyanes dégradées, les sels, les acides (CH_3COOH) et les sucres.

— Les complexes Tanins-polysaccharides (T.P) dont la masse moléculaire est très élevée. Ils sont formés de flavanols, de sucres et de sels.

TABLEAU I

Structure de vins d'âges différents en composés phénoliques

	T g/l	A mg/l	T.P	TtC	T.C	T.A + T	P + C	Al	Ap
Vin de 1975	3,18	468	21	28	6	39	6	53	47
Vin de 1975	2,34	531	18	8	13	44	17	50	50
Vin de 1972	2,60	110	17	25	23	23	12	30	70
Vin de 1962	3,85	45	24	35	22	14	5	8	92
Vin de 1951	3,10	40	35	20	35	10	0	0	100
Vin de 1921	4,25	18	41	7	40	12	0	0	100

T : Tanins A = Anthocyanes
T.P : Complexe Tanins-polysaccharides.
TtC : Tanins très condensés — TC : Tanins condensés.
T.A : Complexe Tanins-Anthocyanes.
T : Tanins peu condensés — P + C : Procyanidines + Catéchines.
Al : Anthocyanes libres.
Ap : Anthocyanes polymérisées.

Cette méthode permet d'obtenir en plus de l'isolement des fractions pures, la structure du vin en composés phénoliques, c'est-à-dire la proportion respective de chaque fraction par rapport à la quantité totale (tabl. 1). Ceci présente un grand intérêt pour l'interprétation de deux caractéristiques essentielles du vin, la couleur et les propriétés organoleptiques.

Interprétation de la couleur

Dans le vin rouge, la couleur dépend surtout de la quantité de molécules d'anthocyanes sous forme colorée dans les conditions de conservation du vin. Cette quantité est à la fois fonction du pourcentage d'anthocyanes combinées, du pH et du SO_2; ces deux dernières conditions agissent surtout sur les anthocyanes libres.

Un vin possédant un pourcentage élevé de complexes (T.A), un pH de 3,8 et 30 mg /l de SO_2 libre sera aussi coloré que celui qui aura beaucoup d'anthocyanes libres (Al), un pH de 3,4 et très peu de SO_2 libre; les nuances seront différentes, le premier sera rouge foncé, tandis que le second sera rouge vif.

Au cours du vieillissement, les (A.l) disparaissent et la couleur est due en presque totalité aux formes condensées (TtC), (TC) et aux combinaisons (T.A).

Interprétation des caractères organoleptiques

L'astringence semble provenir d'un déséquilibre, c'est-à-dire d'un excès au niveau d'une classe de tanins.

— La fraction la plus active vis-à-vis des protéines de la salive est celle correspondant aux tanins condensés (TC) dans le cas du vin jeune; les fractions (T.P) et (TC) isolées des vins vieux sont bien moins actives.

Cette différence semble provenir de la désactivation de ces molécules due d'une part à la polymérisation et d'autre part à la combinaison avec les sels, les acides et les sucres. Ceci expliquerait l'assouplissement des vins astringents au cours du vieillissement.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 257-259

INTERVENTION

La qualité des vins rouges issus du procédé de macération mécanique

C. CANTARELLI

Istituto di Tecnologie Alimentari
Université de Milan (Italie)

La production du vin est liée à des procédés qu'on considère comme rationnels parce que traditionnels. On oublie que la technologie des grands vins est le résultat d'un effort d'amélioration, qui représente le progrès séculaire de l'œnologie.

Il y a néanmoins lieu de reconsidérer certaines phases de la vinification, tout particulièrement la préparation du moût.

Si l'on examine les opérations de traitement du raisin, on peut distinguer trois différentes conditions d'extraction, soit :

— séparation du jus « libre » (foulage et égouttage),

— extraction du jus « lié » (pressurage),

— solubilisation des composés liés au niveau subcellulaire (macération et lessivage).

Des progrès importants pour l'amélioration de cette extraction ont été réalisés en vue d'améliorer le rendement et de réduire les frais de transformation, notamment dans les travaux de cuvaison des vins rouges. On peut rappeler :

— la mécanisation et l'automation des opérations de pressurage, foulage, séparation et décharge des marcs;

— le remplacement de la macération fermentative par une plasmolyse avant fermentation, par chauffage (dans certains fruits par congélation), et aussi bien par macération carbonique et par traitements enzymatiques.

Ces techniques, bien que représentant une modification radicale de la technique traditionnelle, ont été adoptées dans bien des cas et ont fait l'objet de nombreuses études. Dans ce cadre on peut placer nos expériences de macération mécanique.

Cette technique est basée sur la désagrégation poussée des structures du fruit par un broyage ménagé, de façon à obtenir une libération directe du contenu des

vacuoles qui peut être séparé facilement par tamisage et par centrifugation en continu, sans recourir à la pression.

Les essais à l'échelle du laboratoire ont indiqué les niveaux de réduction du matériel pour obtenir l'extraction du contenu cellulaire, suivant l'espèce et la variété du fruit, et les effets complémentaires de la chaleur, du CO_2 et de la fermentation. Par la suite, on a réalisé pendant quatre vendanges des essais de vinification à l'échelle pilote dans différentes régions, avec du raisin rouge et blanc. Ce dernier cas visant surtout à la production de jus et de concentrés.

La technique préconisée comprenait : foulage-égrappage du raisin; broyage; chauffage par un échangeur à spirale; séparation du moût des parties solides par centrifugeuse à vis.

Les variables et les opérations optionnelles étaient les suivantes :

Broyage

Suivant les caractères de résistance mécanique et de localisation des pigments du raisin à traiter, par des broyeurs du type à marteaux, en utilisant des grilles avec des trous de différents diamètres, ou bien par des broyeurs à pieux, en variant la vitesse.

Chauffage

Avec ses effets sur l'activité enzymatique et microbienne, sur la dissolution des substances extractives, ainsi que sur le rendement en jus, en modifiant la compacité des matières solides séparables par centrifugation. L'échange thermique étant beaucoup plus efficace sur le broyat que sur le produit foulé, on peut régler le seuil et la durée du chauffage dans des limites restreintes.

Séparation solide-liquide

Directement par centrifugation ou après égouttage sur tamis vibrant; la vitesse différentielle de la centrifugeuse peut être différente suivant le produit à traiter.

Les nombreux résultats des essais réalisés dans différentes conditions peuvent être résumés, en ce qui concerne la qualité des vins, comme suit :

— Le procédé est très souple, pouvant produire des vins rosés aussi bien que des vins rouges corsés, en variant les conditions de broyage et de chauffage. La cession des matières colorantes s'achevant très rapidement, on peut régler le rapport entre colorants, polyphénols et azote d'une façon différente de celle qu'on réalise par macération traditionnelle.

— Les vins rosés issus de ce procédé à froid (avec un sulfitage réduit), ont généralement un caractère plus frais que les vins correspondants de vinification traditionnelle par courte macération.

Les vins rouges, suivant la variété de raisin, peuvent être produits aussi bien à froid qu'à chaud; dans ce dernier cas la teneur en extrait est du même ordre que celle des vins de vinification traditionnelle; néanmoins le rapport entre anthocyanes et tannins peut être nettement plus élevé et les vins plus souples.

— Les modifications qui se produisent au cours du vieillissement présentent des allures différentes suivant le type de vin. Le rosé est d'une bonne résistance,

moins madérisable; le rouge issu du cycle avec chauffage semble vieillir plus rapidement.

— D'une façon générale, en se rapportant aux polyphénols, qui règlent en grande partie le vieillissement, la teneur est moindre que dans les vins de macération. Ceci étant dû au fait, déjà connu et confirmé dans nos essais, qu'au cours de la macération du broyat une bonne partie des polyphénols est insolubilisée. Le rapport entre les différentes fractions phénoliques est différent, soit moins de tannins, plus d'anthocyanes et la même concentration de phénols non flavonoïdes dans toutes conditions d'extraction.

On remarque finalement que le broyage poussé peut atteindre les pépins, mais ce fait ne donne pas une augmentation des tannins, le contact étant très bref entre broyage et centrifugation; on peut par ailleurs avoir la formation de mousses au cours de la fermentation à cause de l'huile qui peut passer dans le moût.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 261-274

Acquisitions récentes sur les phénomènes colloïdaux dans les moûts et les vins

L. USSEGLIO-TOMASSET

Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti (Italie)

Résumé

Les colloïdes de nature glucidique des moûts et des vins, obtenus par précipitation par l'alcool, peuvent être divisés en deux groupes : les pectines d'une part, constituées essentiellement d'acide galacturonique, un autre groupe de colloïdes d'autre part, contenant encore de l'acide galacturonique et pouvant être ultérieurement fractionné en deux parties par électrophorèse sur fibre de verre.

Six monomères entrent dans la structure des colloïdes : le galactose, le mannose, l'arabinose, le rhamnose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique.

Les taux en divers monomères sont très variables selon les poids moléculaires : ceci milite en faveur d'un mélange d'espèces colloïdales.

Dans un vin, on note, une structure de poids moléculaire défini (12 500 environ), constituée d'acide galacturonique, de rhamnose et d'arabinose, non affectée par le vieillissement.

Les levures forment des colloïdes de nature glucidique, constitués essentiellement de mannanes et d'une faible quantité de polymères de glucose.

Le poids moléculaire des colloïdes des moûts et des vins est, pour 60 à 70 p. 100 compris entre 20 000 et 200 000 : moins de 5 p. 100 dépassent la valeur de 500 000 ou sont inférieurs à 6 500.

Les colloïdes des moûts et des vins contiennent de 4 à 16 p. 100 de substances de structure protéique.

Il existe dans les moûts, de façon considérable, ainsi que dans les vins des structures complexes (provenant d'associations entre protéines, colloïdes glucidiques, tanins et pectines) qui possèdent des dimensions moléculaires très élevées.

Une fraction (30 p. 100 environ) des petites quantités de protéines présentes dans les vins, a des poids moléculaires supérieurs à 200 000.

Le phénomène de la « casse protéique » doit être considéré comme le résultat d'association moléculaire entre protéines, glucides, tanins et pectines.

Mots clés : *Moûts — Vins — Colloïdes glucidiques — Fractionnement — Monomères — Composition.*

Colloïdes de nature glucidique

En collaboration avec CASTINO, nous avons consacré une partie de nos recherches à l'étude des colloïdes des moûts et des vins précipitables par l'alcool (USSIGLIO-TOMASSET et CASTINO, 1975). Le but proposé était le suivant : obtenir des précisions sur la composition qualitative et quantitative des colloïdes ainsi que sur leurs dimensions moléculaires et identifier d'éventuelles structures caractéristiques.

Nos recherches ont porté sur les colloïdes de trois moûts (Muscat 1972, Barbera 1972, et Nebbiolo 1973) ainsi que sur ceux des vins correspondants, après fermentation spontanée. Le moût de Muscat a fermenté en blanc à basse température (6 à 7 °C) jusqu'à épuisement des sucres. Les vins de Barbera et de Nebbiolo ont été élaborés par vinification en rouge précédée d'un éraflage. Les colloïdes sont précipités et séparés par centrifugation onze jours après la mise en cuve; dans le cas du vin de Barbera, une deuxième extraction est effectuée après 29 mois de vieillissement.

TABLEAU I

Teneurs en colloïdes totaux de quelques moûts et des vins correspondants

		Colloïdes totaux (par mg/l)
Muscat 1972	Moût	525
	Vin	282
Nebbiolo 1973	Moût	280
	Vin (immédiatement après décuvage)	498
Barbera 1972	Moût	625
	Vin (immédiatement après décuvage)	1 150
	Vin (après 29 mois de vieillissement)	712

Le tableau I rassemble les résultats relatifs aux teneurs en colloïdes totaux obtenus après précipitation par l'alcool.

Dans le cas des moûts on procède à une centrifugation initiale à 10 000 tours par minute pendant 15 minutes; les colloïdes qui précipitent par addition d'alcool sont donc ceux qui sont présents en solution dans le moût limpide.

Les résultats du tableau I mettent en évidence le phénomène déjà signalé (USSEGLIO-TOMASSET, 1959) : après vinification en blanc on enregistre une nette diminution de la teneur en colloïdes totaux; celle-ci provient de l'importante dégradation subie par les pectines au cours de la fermentation alcoolique. Dans la vinification en rouge, après fermentation, on constate une nette augmentation de la teneur en colloïdes totaux, cédés au jus par les parties solides de la grappe.

Les colloïdes du moût

Afin d'identifier les constituants monomères des colloïdes, on réalise, en ampoule fermée, une hydrolyse à 100 °C en milieu sulfurique N, pendant 4 heures. On fait ensuite percoler la solution à travers une petite colonne de résine Dowex I

(AG1 × 8 100-200 mesh) sous forme acétate; l'acide sulfurique et les acides uroniques restent fixés tandis que les sucres sont recueillis dans le percolat.

On concentre et on chromatographie sur papier et sur couche mince; on réalise également une électrophorèse sur papier. On élue ensuite les acides uroniques fixés par la résine au moyen d'acide acétique 2 N; on concentre ce deuxième éluat et on le chromatographie sur couche mince de silice.

La chromatographie sur couche mince de cellulose pour les sucres et celle sur couche mince de silice pour les acides uroniques sont suivies d'une densitométrie. Cette mesure permet de déterminer les proportions relatives des différents constituants; en particulier, on a ainsi trouvé, à côté de l'acide galacturonique

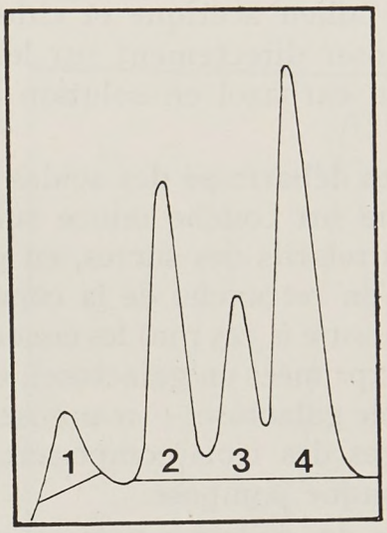


FIG. 1. — *Spectres densitométriques des substances neutres dans l'hydrolysat des colloïdes d'un vin de Muscat 1971.*

1. Rhamnose
2. Arabinose.
3. Mannose.
4. Galactose.

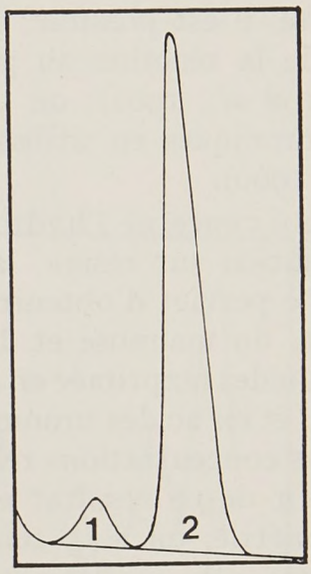


FIG. 2. — *Spectres densitométriques des substances acides dans l'hydrolysat des colloïdes d'un vin de Muscat 1971.*

1. Acide glucuronique.
2. Acide galacturonique.

une faible quantité d'acide glucuronique (6 p. 100 environ de la teneur en acides uroniques totaux).

Les figures 1 et 2 représentent les spectres obtenus et les proportions relatives des divers constituants; les monomères présents dans les colloïdes précipitables des moûts sont les suivants : galactose, mannose, arabinose, rhamnose, acides galacturonique et glucuronique. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux de BUCHI et DEUEL (1954).

Il convient de remarquer que l'analyse approfondie des colloïdes du moût de raisins sains n'a pas permis de mettre en évidence la présence de glucose; malgré la synthèse importante de ce sucre au cours de la maturation du raisin, il n'entre pas dans la constitution des colloïdes solubles.

On peut dire que la structure des colloïdes solubles du moût se rattache à celle du galactose et de l'acide galacturonique; en effet, le L-arabinose également présent dans les colloïdes, possède une configuration dérivant, par décarboxylation, de celle de l'acide galacturonique.

Par ailleurs, des travaux réalisés à l'Institut d'Oenologie de Bordeaux ont

mis en évidence, dans les moûts de raisins botrytisés, la présence de colloïdes polymères du glucose, leur présence est probablement en rapport avec le métabolisme de *Botrytis cinerea*.

Dans les vins, on trouve normalement de petites quantités de polymères du glucose; ceux-ci, cependant, ne proviennent que du métabolisme levurien.

Après l'identification des monomères constitutifs des colloïdes, nous avons mis au point une méthode de dosage de chaque composant. Pour cela, nous avons conjointement utilisé la spectrophotométrie d'absorption (visible et ultra-violet) et la chromatographie sur couche mince suivie d'une densitométrie; en effet, chaque composant, chauffé en présence d'acide sulfurique convenablement concentré donne dans l'ultra-violet un spectre caractéristique; une mesure à 325 nm permet de calculer la somme des contributions de chaque composant.

En outre, il est possible, sur les colloïdes, de doser directement l'arabinose au moyen de la réaction au phloroglucinol en milieu acétique et chlorhydrique (Bolognani *et al.*, 1961); on peut également doser directement sur les colloïdes des acides uroniques en utilisant la réaction au carbazol en solution sulfurique (Gregory, 1960).

En ce qui concerne l'hydrolysat des colloïdes débarrassé des acides uroniques après percolation sur résine, la chromatographie sur couche mince suivie d'une densitométrie permet d'obtenir les pourcentages relatifs des sucres, en particulier du galactose, du mannose et du rhamnose. Si l'on retranche de la concentration totale en colloïdes (exprimée en galactose après mesure à 325 nm) les concentrations en arabinose et en acides uroniques (également exprimées en galactose), on obtient la somme des concentrations relatives à l'ensemble galactose + mannose + rhamnose; à partir de ce résultat et des pourcentages des trois composants obtenus par densitométrie, on a la concentration en chaque composé.

Les pectines des moûts peuvent être séparées des colloïdes par saponification, à température ambiante, à pH 9,5 pendant 6 heures; on porte ensuite le pH à 6,5 avec de l'acide acétique; enfin, par addition de chlorure de calcium on obtient un précipité gélatineux de pectate de calcium que l'on sépare par centrifugation. Les autres colloïdes sont précipités par addition d'alcool au surnageant. Le pectate de calcium est dissous dans l'acide sulfurique largement dilué puis précipité à nouveau après neutralisation du milieu et addition de $CaCl_2$; le nouveau précipité recueilli et séché sous vide ne présente qu'une teneur de 63,9 p. 100 en acide galacturonique. Après hydrolyse acide du pectate, on remarque la présence d'arabinose, de rhamnose et de galactose.

Cependant, si l'on solubilise le pectate de calcium par agitation en présence de résine cationique Na^+ et si l'on soumet la solution à l'électrophorèse sur fibre de verre, on obtient un composé mobile, constitué presque exclusivement d'acide galacturonique. On peut donc en conclure que, même si les pectines (ainsi que le montrent les phénomènes de coprécipitation) présentent une tendance remarquable à s'associer avec d'autres colloïdes, il ne semble pas que leur structure moléculaire contienne de grandes quantités de monomères différents de l'acide galacturonique.

Détermination des poids moléculaires

La détermination des poids moléculaires a été réalisée grâce à la technique de filtration sur gel, en utilisant le Sepharose 6 B (Pharmacia) comme élément filtrant; il est ainsi possible de fractionner des substances dont les poids moléculaires

sont compris entre quelques milliers et un million; ce gel présente, d'autre part, une remarquable compacité ainsi qu'une bonne perméabilité sous la pression atmosphérique, aux solutions aqueuses (ceci malgré la grandeur des mailles du réseau tridimensionnel).

L'étalonnage de la colonne (c'est-à-dire l'établissement de la correspondance entre volumes d'élution et poids moléculaires de molécules-témoins) est réalisé au moyen de dextranes du commerce de distribution connue des poids moléculaires; ce procédé, un peu laborieux, permet cependant l'établissement d'une très bonne courbe étalon donnant la correspondance entre le volume d'élution et le logarithme des poids moléculaires.

Le volume total de la couche filtrante est de 461,7 ml; la filtration est réalisée à partir de 100 g de colloïdes dissous dans 2 ml de Na_2SO_4 0,05 M et en procédant

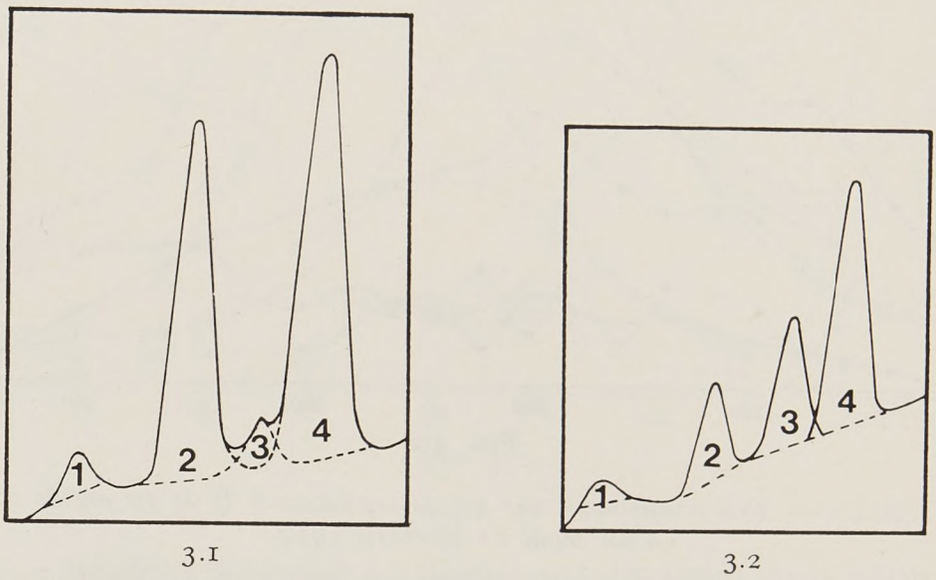


FIG. 3.1 et 3.2. — *Composition des colloïdes du moût de Muscat 1972 après élimination des pectines.*

3.1 : *Poids moléculaire de 125 000.*
3.2 : *Poids moléculaire de 50 300.*

1. Rhamnose.
2. Arabinose.
3. Mannose.
4. Galactose.

à l'élution avec le même solvant. Les fractions, de 5 ml chacune, sont recueillies au moyen d'un collecteur; sur chacune on détermine tous les composants présents. Pour chaque colloïde on établit ainsi un diagramme d'élution de chacun des monomères constitutifs et on obtient la composition des colloïdes correspondant aux divers poids moléculaires.

On montre ainsi que les poids moléculaires de 60 à 70 p. 100 des colloïdes des moûts sont compris entre 20 000 et 200 000; 10 à 15 p. 100 ont un poids moléculaire supérieur à 200 000, 5 p. 100 inférieur à 10 000.

La comparaison des spectres densitométriques (fig. 3.1 et 3.2) montre que la composition colloïdale varie considérablement selon les divers poids moléculaires; ces spectres se rapportent à la composition des colloïdes du moût de Muscat pour les poids moléculaires respectifs de 125 000 et 50 300.

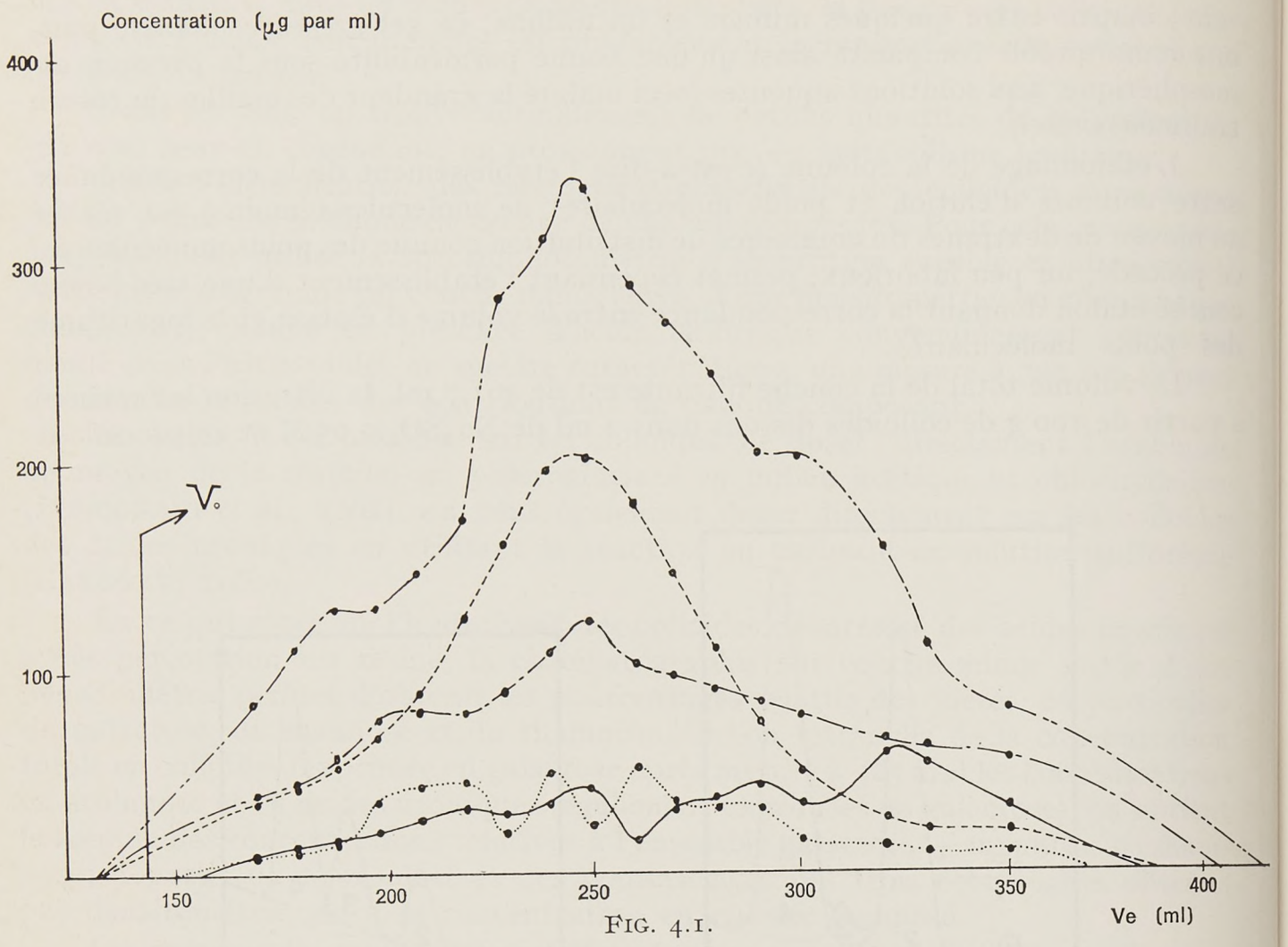


FIG. 4.1.

FIG. 4.1 et 4.2 — *Fractionnements sur gel de sepharose 6 B de 10 mg de colloïdes d'un moût de Barbera 1972.*

4.1 : *après élimination des pectines en solution dans 2 ml de* Na_2SO_4 *0,05 M.*
4.2 : *En solution dans 2 ml de* Na_2SO_4 *0,05 M.*

Galactose — .. — .. — .. —
Mannose ————————
Arabinose — — — — —
Rhamnose .....
Acides uroniques — . — . — . —

La différence de composition des colloïdes des moûts (obtenus après élimination des pectines) en fonction des divers poids moléculaires suggère l'existence non pas d'un unique colloïde de structure complexe (on aurait dans ce cas une composition constante, indépendante du poids moléculaire) mais d'un mélange de colloïdes de compositions différentes.

Les colloïdes provenant des levures

Afin de caractériser les colloïdes cédés par les levures, on prépare un milieu synthétique (WICKERHAM, 1951) que l'on ensemence par une souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Après incubation de 20 jours à 20 °C on précipite les colloïdes par addition d'alcool. L'analyse des sucres, après hydrolyse, met en évidence la seule présence de mannose ainsi que d une faible quantité de glucose (environ

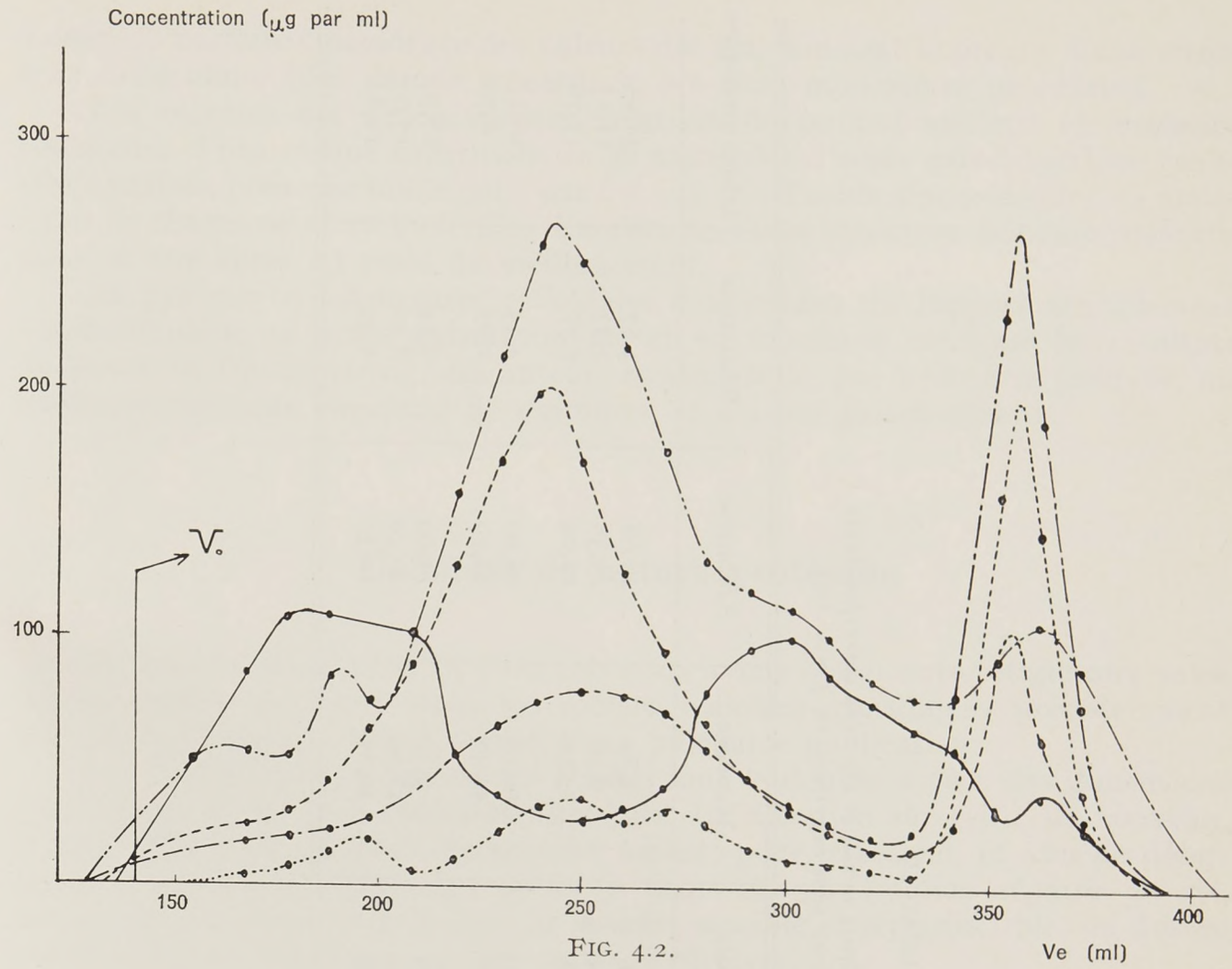


FIG. 4.2.

28 p. 100). Les colloïdes cédés par les levures ont des poids moléculaires supérieurs à ceux du moût; 24 p. 100 ont un poids supérieur à 500 000, 74 p. 100 dépassent 50 000.

Les colloïdes des vins

Lorsqu'on passe du moût au vin, deux phénomènes différencient les colloïdes des deux milieux; d'une part, dans le vin, à la suite de l'action de la polygalacturonase du moût, presque toutes les pectines sont transformées par hydrolyse en acide galacturonique; d'autre part, apparaissent des polymères du mannose (ainsi qu'en quantité plus faible, des polymères du glucose) provenant de l'action des levures au cours de la fermentation alcoolique.

Les colloïdes du vin sont nettement plus riches en mannose que ceux des moûts correspondants. Ce résultat est mis en évidence par les résultats rassemblés dans le tableau 2.

La distribution des poids moléculaires est semblable à celle des moûts, avec une légère augmentation de la proportion en colloïdes à poids moléculaires plus élevés provenant des levures.

La figure 4/2 montrant le diagramme d'élution des colloïdes du vin de Barbera 1972 se révèle particulièrement intéressante; correspondant au volume d'élution de 355 ml (c'est-à-dire au poids moléculaire d'environ 12 500) on remarque la superposition, pour des maxima, de trois pics minces et symétriques; ce sont ceux de l'acide galacturonique, du rhamnose et de l'arabinose. La forme des pics,

TABLEAU 2

Composition des colloïdes de quelques moûts et des vins correspondants
(les pourcentages de monomères sont exprimés en poids sec)

		Galactose	Mannose	Arabinose	Rhamnose	Acides uroniques
Nebbiolo 1973	Moût avant élimination des pectines. . .	37,68	3,82	15,68	3,87	38,95
	Moût après élimination des pectines. . .	51,34	9,36	25,38	2,73	11,13
	Vin immédiatement après décuvage . .	38,42	25,50	17,04	5,28	13,76
Muscat 1972	Moût après élimination des pectines. . .	51,30	10,10	18,00	4,33	16,27
	Vin	45,00	34,40	11,79	2,05	6,76
Barbera 1972	Moût après élimination des pectines. . .	45,68	7,30	21,99	6,24	18,79
	Vin immédiatement après décuvage. . .	34,92	18,30	20,20	8,96	17,62
	Vin après vieillissement de 29 mois. . . .	31,64	39,85	12,30	5,39	10,82

comme la parfaite coïncidence des valeurs des maxima sont la preuve d'une structure moléculaire bien définie, constituée des trois monomères précédents.

Les mesures des concentrations relatives de ceux-ci mettent en évidence l'existence d'une chaîne constituée de 30 molécules d'acide galacturonique (remplacé parfois, pour une faible part, par 6 à 7 p. 100 d'acide glucuronique), 24 molécules de rhamnose et 12 molécules d'arabinose. Cette structure demeure présente dans le vin après 29 mois de vieillissement.

La présence de structures colloïdales comportant un rapport sensiblement équimoléculaire en acide galacturonique et en rhamnose confirme les résultats de Buchi et Deuel (1954); ces auteurs avaient isolé, par hydrolyse partielle, un acide aldobionique constitué de rhamnose et d'acide galacturonique.

Colloïdes de nature protéique

En collaboration avec Di Stefano nous avons élargi notre étude aux substances azotées présentes dans les mêmes colloïdes glucidiques précédemment étudiés. Les résultats feront l'objet d'une prochaine publication.

Ces colloïdes ont également été étudiés sous le double aspect des dimensions moléculaires et de la composition chimique. La filtration sur gel a, de nouveau, constitué le moyen d'étude du premier aspect; pour le second, et afin de déterminer la nature des protéines présentes dans chaque fraction séparée du gel, nous avons employé la technique de Rosen, sensible et reproductible, du dosage colorimétrique des amino-acides après hydrolyse.

Les gels utilisés ont été le Sepharose 6 B (en étalonnant la colonne avec des protéines de poids moléculaire connu) et le Biogel A 50 M, élément filtrant propre au fractionnement de molécules de poids moléculaires très élevés (de 800 000 à 50 000 000); naturellement, ce dernier gel n'a pas été employé pour déterminer la valeur exacte du poids moléculaire de molécules si lourdes (ce qui, du reste, est impossible faute de molécules-témoins) mais pour mettre en évidence la présence éventuelle de complexes possédant des molécules beaucoup plus grosses que celles identifiées jusqu'ici.

L'analyse s'effectue par filtration sur gel, à partir de 25 mg de colloïdes dissous dans 2 ml de KCl 0,1 M et en éluant avec le même solvant.

Le tableau 3 rassemble les pourcentages de protéïnes (N × 6,25) déterminés dans les colloïdes étudiés.

Le diagramme d'élution sur Sepharose 6 B, des protéines présentes dans les colloïdes du moût de Muscat 1972 montre la présence d'un pic au volume d'exclusion Vo — donc au poids moléculaire supérieur à 1 000 000 —. Ce pic représente 51 p. 100 des protéines totales; les autres protéines se trouvent réparties presque uniformément en faibles quantités depuis des poids moléculaires supérieurs à 300 000 jusqu'à ceux inférieurs à 10 000.

La présence surprenante, dans les colloïdes des moûts, de complexes protéiques d'aussi grosses dimensions moléculaires nous a incités à analyser plus en détail le complexe qui, sur Sepharose 6 B, se présente sous forme d'un pic symétrique aux environs du volume d'exclusion. Dans ce but, à partir du fractionnement sur Biogel A 50 M, on effectue, sur chaque fraction, outre la détermination des protéines celle des glucides totaux, des leucoanthocyanes et des acides uroniques. Les glucides totaux et les acides uroniques sont dosés au moyen des méthodes

TABLEAU 3

Teneurs en protéines de quelques moûts et de vins correspondants

			Taux de protéines (p. 100 de la teneur en colloïdes totaux)
Muscat	1972	Moût	15,9
		Vin	11,3
Barbera	1973	Moût	6,8
		Vin	3,5
Nebbiolo	1973	Moût	7,1
		Vin	4,6
Pinot blanc	1973	Moût	4,4

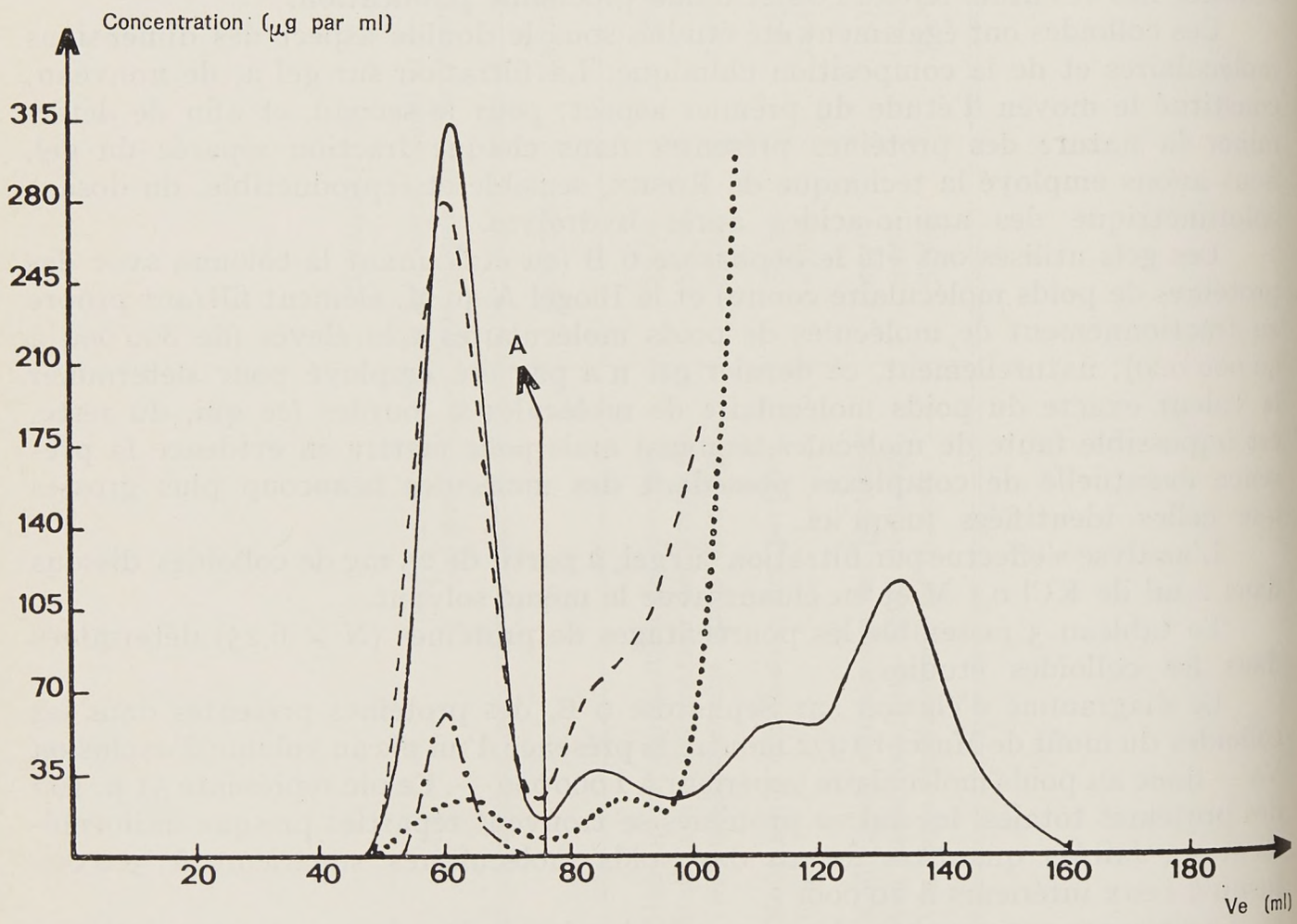


FIG. 5. — *Filtration sur colonne de Biogel A 50 M des colloïdes précipités par l'alcool d'un moût de Moscato 1972. 50 mg dissous dans 2 ml de KCl 0,1 N.*

Composition du pic A

——————— protéines 43,8 %.
- - - - - - - - - - glucides 45,4 %.
— . — . — . — leucoanthocyanes 60 %.
. . . . . acides uroniques 4,8 %.

précédentes; les leucoanthocyanes le sont en reprenant dans 5 ml de butanol — HCl (5 : 1 V/V) 1 ml d'éluat évaporé à sec sous vide; on chauffe à 100° pendant 30 min et on procède au dosage selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1972).

Les résultats sont représentés par le diagramme d'élution de la figure 5.

Celle-ci montre l'existence d'un complexe de poids moléculaire très élevé incluant la présence de structures protéiques, de tanins et de pectines ainsi que d'un colloïde de nature glucidique; celui-ci, après hydrolyse, se révèle composé essentiellement de galactose et d'arabinose, avec de plus faibles quantités de mannose et de rhamnose.

Dans le moût de raisin frais, les protéines, les leucoanthocyanes et les colloïdes glucidiques exercent donc mutuellement une interaction qui contribue à la formation de complexe colloïdaux encore solubles mais d'un poids moléculaire très élevé.

Peu après, on assiste à l'augmentation progressive du poids moléculaire de ces complexes; en l'espace de deux jours il se forme un précipité insoluble de composition similaire à celle que nous avons identifiée bien que plus riche en tanins. Ces résultats sont obtenus à partir de l'analyse de la composition du précipité formé au bout de deux jours dans des moûts parfaitement limpides, puis centrifugé et additionné de chloroforme pour stabilisation.

En ce qui concerne le Vin de Muscat correspondant, on remarque une diminution considérable du pic protéique correspondant au complexe de poids moléculaire élevé. Cependant, plus de la moitié des faibles quantités de protéines précipitables par l'alcool (environ 30 mg/l) ont des poids moléculaires supérieurs à 200 000; dans la partie restante, la distribution des poids moléculaires varie de 200 000 à environ 15 000. Les résultats obtenus à partir de la filtration sur gel indiquent donc la présence de faibles teneurs en protéines qui jouent un rôle important dans la formation de complexes colloïdaux de poids moléculaires beaucoup plus élevés que ceux communément attribués aux protéïnes des vins.

Des résultats semblables ont été obtenus en analysant les colloïdes du vin rouge de Barbera 1972, précipités après plus de deux ans de vieillissement du vin; on constate qu'il reste de faibles quantités de colloïdes protéiques avec la distribution suivante des poids moléculaires (tabl. 4).

Les protéines des colloïdes obtenus à partir d'autres moûts et d'autres vins offrent des caractéristiques tout à fait comparables.

En ce qui concerne les protéines cédées par les levures, elles représentent

TABLEAU 4

Distribution des poids moléculaires des colloïdes protéiques d'un vin de Barbera après plus de 2 ans de vieillissement

Poids moléculaire	Taux de protéines totales (p. 100 du poids sec)
> 200 000	34,4
Entre 200 000 et 100 000	9,5
Entre 100 000 et 50 000	10,7
Entre 50 000 et 15 000	36,5
< 15 000	8,9

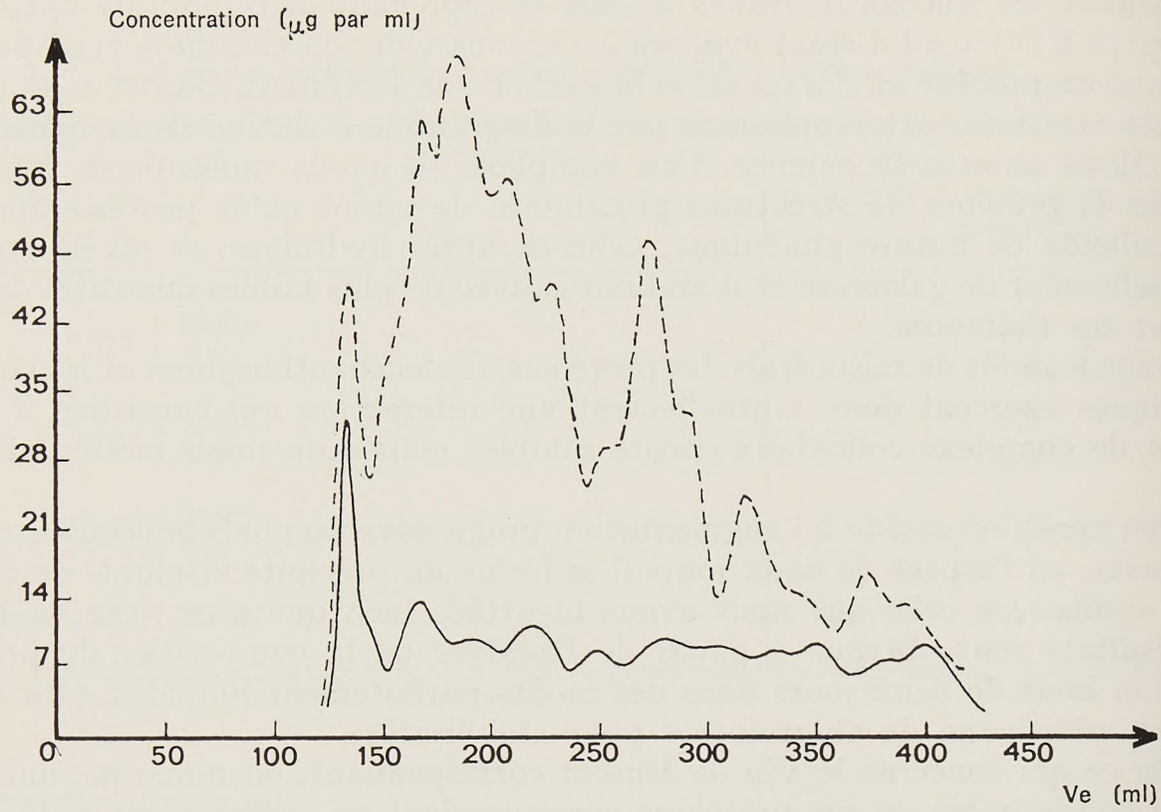


FIG. 6. — *Filtration sur colonne de sépharose 6 B des colloïdes cédés à un milieu synthétique par la levure : colloïdes précipités par l'alcool.*

Protéines ————————
Glucides - - - - - - - - - -

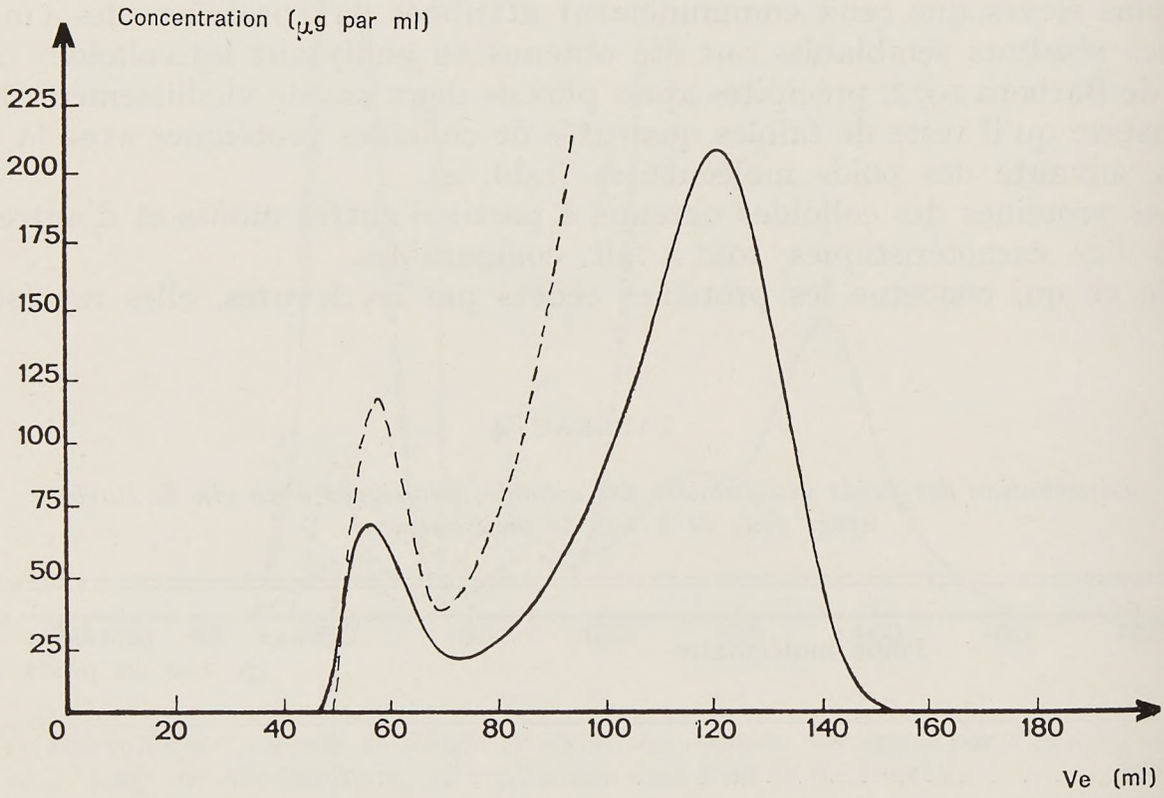


FIG. 7. — *Filtration sur colonne de Biogel A 50 M des colloïdes cédés à un milieu synthétique par la levure : colloïdes précipités par l'alcool.*

Protéines ————————
Glucides - - - - - - - - - -

environ 30 p. 100 des colloïdes totaux; leurs caractéristiques sont celles représentées sur les diagrammes d'élution des figures 6 et 7, le premier obtenu sur Sepharose 6 B, le second sur Biogel A 50 M.

La filtration sur Sepharose 6 B permet d'obtenir la distribution suivante des poids moléculaires (tabl. 5).

Le diagramme d'élution de la figure 7 montre l'existence d'un complexe de poids moléculaire très élevé constitué d'environ 47 p. 100 de protéines et de 53 p. 100 de glucides.

Tous ces résultats sont obtenus à partir de colloïdes de moûts et de vins précipités par addition d'alcool.

TABLEAU 5

Distribution des poids moléculaires des colloïdes protéiques provenant des levures (filtration sur Sépharex 6 B)

Poids moléculaire	Taux de protéines totales (% du pois sec)
> 300 000	43,8
Entre 300 000 et 200 000	3,4
Entre 200 000 et 100 000	7,4
Entre 100 000 et 50 000	8,9
Entre 50 000 et 25 000	11,1
Entre 25 000 et 13 000	16,7
< 13 000	8,7

En vue de confirmer la formation de complexes macromoléculaires dans le moût frais, celui-ci a été analysé sans traitement préalable autre qu'une centrifugation. L'analyse a porté sur deux moûts de 1976, l'un de Pinot Blanc, l'autre de Riesling italien. 4 ml de moût centrifugé sont ainsi fractionnés sur Biogel A 50 M; dans les fractions on procède à l'analyse des protéines, des glucides, des leucoanthocyanes et des pectines, en mettant en évidence l'existence d'un complexe de poids moléculaire très élevé, semblable à celui rencontré dans les colloïdes des moûts précipités par addition d'alcool.

Ces résultats montrent que les protéines du vin sont très différentes de celles isolées, par d'autres techniques, à partir du raisin. Les mécanismes de la « casse protéique » doivent également être considérés comme des phénomènes mettant en jeu d'autres colloïdes; il n'est plus possible de les assimiler à une simple coagulation de protéines. Koch et Bretthauer (1957) n'ont en effet retrouvé, sur 40 mg de précipité isolé à partir de 200 bouteilles, que 40 à 50 p. 100 de protéines.

Summary

Progress about colloidal phenomenons occuring in musts and wines

The colloids having a glucidic nature which are obtained from musts and wines by means of alcoholic precipitation can be divided into two groups:

1. the pectins composed essentially of galacturonic acid

2. a group also containing galacturonic acid which can be ultimately fractioned into 2 groups by Fibre-glass electrophoresis.

Six monomers of colloidal structure exist: galactose, mannose, arabinose, rhamnose, galacturonic acid and glucuronic acid.

The concentrations of the various monomers vary considerably with molecular weight indicating mixtures of colloidal types.

In one wine a definite molecular weight structure, about (12 500), was found containing galacturonic acid, rhamnose and arabinose. It was not affected by ageing.

Glucidic colloids formed from yeast activity contain essentially mannanes and a small quantity of glucose polymers.

Between 60 and 70 p. 100 of the molecular weights of wine and must colloids lie between 20 000 and 200 000; less than 5 p. 100 are found over 500 000 or below 6 500.

The composition of wine and must colloids includes 4-16 p. 100 of protein substances.

Complex structures with very large molecular dimensions (arising from associations between proteins, glucidic colloids, tannins and pectins) are found in considerable quantities in musts as well as in wines.

About 30 p. 100 of the small quantities of proteins present in wines have molecular weights which surpass 200 000.

The phenomena of « protein clouding » must be considered as the result of molecular associations between proteins, glucides, tannins and pectins.

Key-words: *Musts — Wines — Glucidic colloids — Fractionating — Monomers — Composition.*

Références bibliographiques

BUCHI W., DEUEL H., 1954. Uber ein Polysaccharid im Beerensaft von *vitis vinifera*, *Helvetica Chimica Acta*, **37**, 1392.

BOLOGNANI L., COPPO G., ZAMBOTTI V., 1961. *Expérientia*, **17**, 67.

GREGORY J. D., 1960. *Arch. Biochem. Biophysics*, **89**, 157.

KOCH J., BRETTHAUER G., 1957. Zur kenntnis der Eiweisstoffe des Weines I Mitteilung. Chemische Zusammensetzung des Warmetrubes Kurtzeiterhitzer Weissweine und seine Bezehung zur Eiweisstrubung und zum Weineisweis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **106**, 272.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P., RIBÉREAU-GAYON P., 1972. *Traité d'Œnologie*, Tome I, Dunod, Paris.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1959. L'evoluzione delle sostanze colloidali dal mosto al vino. *Ann. Sper. Agr. n. s.*, **13**, 385.

USSEGLIO-TOMASSET L., CASTINO M., 1975. I colloidi solubili di natura glucidica dei mosti e dei vini, *Riv. Vitic. Enol.*, **28**, 328; ibidem 374; ibidem 401.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. Les colloïdes glucidiques solubles des moûts et des vins. *Conn. Vigne Vin*, **10**, 193.

WICHERHAM L. J., 1951. Taxonomy of yeasts, *Tech. Bull.*, **1029**, Dept. Agr. Washington, D.C.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 275-277

INTERVENTION

La production par *Botrytis Cinerea* d'un glucane responsable des difficultés de clarification de certains vins issus de raisins pourris

D. DUBOURDIEU

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II (France)

Introduction

Nous présentons dans cette note les premiers résultats d'une étude de la nature et de l'origine du polysaccharide de certains vins de raisins pourris, responsable de leurs difficultés de clarification. LABORDE a décrit pour la première fois la précipitation d'une telle substance par l'alcool, sous forme de filaments caractéristiques; d'après cet auteur, *Botrytis cinerea* attaque la cellulose de la peau de raisin, grâce à une diastase, et fabrique un mucilage visqueux de nature mucocellulosique, la « dextrane », terme repris plus tard au masculin.

Isolement par précipitation fractionnée par l'éthanol d'un polymère de glucose dans certains vins issus de raisins pourris

La précipitation fractionnée, méthode classique de séparation d'un mélange complexe de polysaccharides a été appliquée au vin; à un volume de vin, on ajoute successivement 0,5, 0,5, 1 et 3 volumes d'éthanol à 95°; les différents précipités obtenus, $P_{0,5}$, P_1, P_2 et P_5, séparés par centrifugation, sont lavés à l'alcool puis redissous dans l'eau tiède. Sur chaque solution, on dose les oses neutres par la méthode au phénol et les acides par la méthode au carbazol avec les corrections indiquées par MONTREUIL *et al.*

Le précipité $P_{0,5}$, caractéristique d'un vin contenant des mucilages colmatants, présente un aspect filamenteux; les précipités suivants sont floconneux.

La composition en monomères des précipités est déterminée par méthanolyse et trifluoroacétylation, les monosaccharides sont donc analysés par chromatographie en phase gazeuse des dérivés trifluoroacétylés des o-méthylglycosides. Les résultats montrent que $P_{0,5}$ est pratiquement un polymère de glucose pur, tandis que le mannose prédomine dans P_1; les précipités P_2 et P_5 ont des compositions plus complexes (pentoses, hexoses, et acide galacturonique).

Nous proposons le terme de « glucane » pour désigner le polymère de glucose isolé ($P_{0,5}$), de préférence au terme de « dextrane » qui désigne des polysaccharides bactériens bien définis et constitués par la condensation de D-glucoses liés en α (1 - - - 6); ces dextranes bactériens ont des propriétés différentes du glucane de *Botrytis* en milieu alcoolique et les dextranases sont inefficaces sur ce dernier polysaccharide.

Origine du glucane et facteurs favorisant sa présence dans les moûts et dans le vin

Le rôle de *Botrytis cinerea* dans l'apparition de ce glucane est bien mis en évidence par l'étude des broyats de raisins sains et pourris. Mais le traitement mécanique de la vendange intervient aussi pour assurer la diffusion dans le moût de ce polysaccharide qui est localisé entre la pellicule et la pulpe; un pressurage modéré de raisins pourris entiers peut conduire à un vin relativement facile à clarifier; la même vendange subissant un traitement mécanique brutal (foulage, pompage, transfert par vis...) est susceptible de donner un vin dont la filtration est pratiquement impossible.

Des cultures effectuées sur milieux synthétiques, ont montré que *Botrytis cinerea* ne forme pas ce glucane à partir de la paroi cellulaire de la peau de raisin comme le pensait LABORDE, mais à partir d'une source d'hexose quelconque (glucose, mannose, galactose). Adhérent au mycélium, le glucane présente l'aspect d'une gelée visqueuse et translucide.

Étude de la structure du glucane de *Botrytis cinerea*

Le poids moléculaire, déterminé par tamisage moléculaire sur Sépharose 6B par comparaison avec du dextrane Pharmacia donne une répartition comprise entre 100 000 et 2 000 000; les poids moléculaires supérieurs à 500 000 représentent 85 p. 100 du poids total. Les chiffres sont confirmés par ultracentrifugation qui donne un poids moléculaire moyen de 912 000.

La structure moléculaire est actuellement à l'étude par perméthylation suivie d'une méthanolyse. D'après les premiers résultats, il s'agirait d'un glucane, voisin de ceux formés par certains autres champignons; il serait constitué d'une chaîne principale de D-glucose avec des liaisons β (1 - - - 3); sur cette chaîne il interviendrait approximativement toutes les quatre molécules de sucre, le branchement d'une autre molécule de glucose liée en β (1 - - - 6).

Des hydrolyses chimiques partielles, ainsi que l'emploi d'enzymes spécifiques doivent permettre de résoudre définitivement ce problème de structure.

Il est remarquable de constater aussi que le pouvoir colmatant du glucane de *Botrytis cinerea* apparaît uniquement en milieu alcoolique : les moûts de vendange pourrie sont plus faciles à filtrer que les vins correspondants. On peut admettre, en milieu alcoolique, l'association, par la formation de liaisons de type hydrogène, de chaînes voisines qui forment alors un réseau tridimensionnel retenu par les couches filtrantes et agissant comme colloïde protecteur.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 279-288

Les agents de stabilisation biologique des vins

J. FARKAŠ

Centre de Recherches des Entreprises Vinicoles
Modra (Tchécoslovaquie)

Résumé

L'auteur a mis au point un moyen de conservation des vins à teneur élevée en sucre résiduaire par l'acide 3-(5-nitro-2-furyl) acrylique (5-NFA), commercialisé sous le nom de Mikrostabil. Le 5-NFA possède une importante action inhibitrice à large spectre d'action sur les microorganismes (levures et bactéries) dans le moût et le vin. Il agit dès la dose de 10 mg/l. Après de nombreux essais toxicologiques les Ministères de la Santé Publique en Slovaquie et en Bohême, l'ont autorisé pour la stabilisation des vins.

L'auteur a élaboré des méthodes de dosage polarographique et spectrophotométrique de l'acide 5-nitrofurylacrylique dans le vin, ainsi que les procédés d'application de cette substance dans les conditions de la production vinicole.

Mots clés : *Vins — Conservation — Acide 5-nitrofurylacrylique (5-NFA) — Inhibition — Microorganismes — Méthodes de dosage.*

Introduction

Cet exposé est consacré à l'acide 5-nitrofurylacrylique, dénommé commercialement MIKROSTABIL (R.), inhibiteur des microorganismes, levures et bactéries des moûts et des vins et qui, de cette façon se comporte comme agent de la stabilisation biologique du vin.

Dans le cadre des recherches de méthodes de stabilisation plus efficaces, nous avons fait l'essai de plusieurs substances. Nous avons montré (FARKAŠ et KOVÁČ, 1967) la supériorité de l'acide 5-nitrofurylacrylique sur toutes les autres substances, ce qui a été confirmé par des études ultérieures.

Plusieurs auteurs ont étudié les interactions entre le milieu et les microorganismes. D'importants résultats furent obtenus par RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1966, 1969, 1975).

Les processus microbiologiques se déroulant dans le vin sont étroitement liés aux autres processus et facteurs. Ils peuvent par exemple être stimulés ou

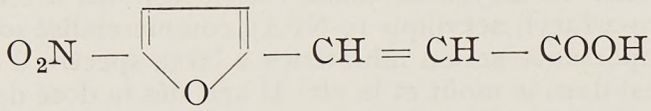
inhibés par le changement de pH (KIELHÖFER et WÜRDIG, 1963) ou par des changements de la teneur en tartrates (WÜCHERPFENNIG, 1974).

Aujourd'hui, on utilise le plus souvent l'acide sorbique pour la stabilisation des vins à teneur élevée en sucre. MINÁRIK (1962) et MINÁRIK et NAVARA (1976), ASVANY ont étudié les effets de l'acide sorbique et ont conclu que certaines souches de levures sont déjà résistantes et que l'acide sorbique possède une action inhibitrice assez réduite sur les bactéries du vin. De plus, dans les vins à teneur faible en SO_2, il se développe parfois un goût de géranium. Nous avons montré (FARKAŠ, 1972) que l'acide sorbique est une source nutritive carbonée pour les bactéries lactiques du vin, ce qui a été confirmé par RADLER (1976).

PRILLINGER (1955) et beaucoup d'autres auteurs ont observé qu'en utilisant le pyrocarbonate d'éthyle pour la stabilisation du vin, il se forme à peu près 5 p. 100 de di-éthylcarbonate, ayant des propriétés nuisibles sur l'organisme humain. C'est pourquoi on essaie à présent le pyrocarbonate de méthyle.

Acide 5-nitrofurylacrylique (mikrostabil R)

L'acide 5-nitrofurylacrylique, plus précisément l'acide 3-(5-nitro-2-furyl) acrylique, a pour formule développée



Nous nous occupons depuis 1964, de sa synthèse et de son action stabilisatrice sur les vins et sur d'autres produits alimentaires (FARKAŠ et KOVÁČ, 1964, 1965).

C'est une substance cristalline jaune, inodore et sans saveur, stable à la lumière et à la chaleur, en milieu acide. Il est peu soluble dans l'eau, mais très soluble à température élevée et soluble dans l'alcool. Ses sels de sodium et de potassium sont très solubles dans l'eau et dans l'alcool.

Son action inhibitrice sur les microorganismes est forte. Son activité biologique dépend du groupe fixé en position 2 : (CH = CH ou CH = CH*x*). Son spectre d'action est beaucoup plus large que celui des antiseptiques utilisés parce qu'il inhibe non seulement les levures mais aussi les bactéries du vin. La résistance des souches de microorganismes n'a pas été observée. Son action inhibitrice commence à des doses infimes. C'est surtout son sel de sodium qui convient à la stabilisation des vins.

Les esters de cet acide, éthylate ou méthylate, présentent sur certains microorganismes une action encore plus importante que l'acide 5-nitrofurylacrylique lui-même. Cependant, ils sont peu solubles (insolubles dans l'eau 0,3 g/100 ml dans l'alcool seulement). C'est pourquoi l'application au vin en est assez difficile.

Effets fongistatiques et fongicides de l'acide 5-NFA sur la croissance de différentes espèces de levures et de bactéries dans le moût débourbé

Dans cette expérimentation, nous avons pris huit espèces de levures, *Saccharomyces cerevisiae* (*souche Hlinik*), *Saccharomyces bayanus* (*souche Fendant*), *Candida vini*, *Hansenula anomala var. anomala*, *Kloeckera africana*, *Saccharomyces veronae*,

TABLEAU I

Action inhibitrice de l'acide 5-nitrofurylacrylique sur la croissance des levures dans le moût ayant une teneur en sucre de 20 °Kl

Espèce de levures	Témoin	Doses d'acide 5-nitrofurylacryliques (mg/l)									
		5	10	15	20	30	40	45	50	55	60
Saccharomyces vini Hliník. . .	+	+	+	+	+S	+S	+S	+S	S—C ±	C —	
Saccharomyces oviformis Fendant	+	+	+	+		+S	+S	+S	S—C ±	C	
Candida mycoderma	+	+	+S	+S	+S	S—C ±	C				
Hansenula anomala.	+	+	+	+S	+S	C					
Kloeckera africana	+	+S	+S	+S	S—C ±	C					
Saccharomyces veronae	+	+	+S	+S	+S	S—C ±	C				
Saccharomyces pastorianus . .	+	S—C ±	C —								
Pichia membranaefaciens . . .	+	+S	+S	+S	S—C ±	C					

+ = croissance en poids de levures; +S = effet fongistatique; S—C = effet fongistatique jusqu'à fongicide; C = effet fongicide; $2{,}10^2$/ml = nombre de levures inoculées.

Saccharomyces pastorianus et *Pichia membranaefaciens*. L'encemencement a été réalisé au moyen d'un inoculum contenant 2.10^2 levures par ml. Nous avons recherché les limites de l'effet fongistatique et fongicide sur la croissance des différentes espèces dans le moût débourbé (FARKAŠ, 1973).

Comme il résulte du tableau 1, sur les levures sélectionnées, l'acide 5-NFA opère d'une façon fongistatique dès la dose de 20-30 mg/l et d'une façon fongicide dès 50-75 mg/l, selon l'espèce de levures.

Quant aux levures naturelles, par exemple *Saccharomyces pastorianus*, les effets fongistatiques et fongicides commencent dès la dose infime de 5 mg/l de 5-NFA.

On a pu constater que, dans les vins additionnés de 10 mg/l d'acide 5-NFA la fermentation malolactique ne s'est pas produite. Les vins laissés dans les bouteilles ouvertes et à température élevée ne sont pas atteints par la maladie de la fleur; ils sont également résistants à la piqûre acétique. La dose de 10 mg/l d'acide 5-NFA inhibe la croissance des bactéries *Lactobacillus gracile* et *Lactobacillus hilgardii*.

Effet inhibiteur sur la croissance et sur la multiplication des levures dans le vin

Nous avons suivi les effets inhibiteurs de l'acide 5-NFA dans les vins. Nous avons cultivé quatre espèces de levures : *Saccharomyces cerevisiae* (*souche Hlinik*), *Saccharomyces bayanus* (*souche Fendant*), *Candida vini* et *Hansenula anomala var. anomala*. Pour cet essai, nous avons utilisé un vin blanc 11^0 à 20 g/l et 30 g/l de sucre. La quantité de levures ensemencées était de 5.10^2, 1.10^3 et 2.10^5. Les doses de l'acide 5-NFA de 5, 10 et 20 mg/l. Comme le montre le tableau 2, même la dose de 10 mg/l d'acide 5-NFA empêche totalement l'activité de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces bayanus*. La dose de 5 mg/l prolonge la durée de la phase de latence et empêche totalement la croissance et la multiplication de *Candida vini* et *Hansenula anomala*.

Action de l'acide 5-NFA sur la stabilité et sur les caractères sensoriels des vins

Nous avons appliqué des doses croissantes d'acide 5-NFA dans les vins à teneur élevée en sucre résiduel. Les vins ont été embouteillés et conservés dans les conditions du chai. Dans les intervalles de temps de 3, 6, 12 et 18 mois, nous avons suivi l'action de l'acide 5-NFA, l'évolution de la composition chimique des vins et les conséquences de ce traitement sur les caractères sensoriels des vins (tabl. 3).

Les vins traités par l'acide 5-nitrofurylacrylique sont restés limpides et stables, même 18 mois après l'embouteillage. Comme il résulte du tableau, les doses de 5-10 mg/l sont suffisantes même pour les vins à teneur élevée en sucre résiduel. Les échantillons en œnothèque restent limpides, stables et frais même après 4 ans de vieillissement.

Nous avons suivi l'évolution des caractères sensoriels des vins traités. Nous avons pu observer tableau 4 que les vins traités par l'acide 5-NFA sont meilleurs,

TABLEAU 2

Action inhibitrice de l'acide 5-NFA sur différentes espèces de levures dans le vin à différentes teneurs en sucre

Espèce	Teneur en sucre (g/l)	Nombre de levures	Témoin	Dose de 5-NFA (mg/l)		
				5	10	20
Sacharomyces cerevisiae Hlinik 1	10	$5,10^2$	—	—	—	—
		$2,10^3$	—	—	—	—
	20	$5,10^2$	+	+	—	—
		$1,10^3$	+	+	—	—
Saccharomyces bayanus Fendant	10	$5,10^2$	±	—	—	—
		$1,10^3$	—	—	—	—
	20	$5,10^2$	±	—	—	—
		$1,10^3$	—	—	—	—
Candida vini	10	$5,10^2$	—	—	—	—
		$1,10^3$	—	—	—	—
		$2,10^5$	+	—	—	—
	20	$5,10^2$	+	—	—	—
		$1,10^3$	+	—	—	—
		$2,10^3$	+	—	—	—
Hansenula anomala v. anomala	10	$5,10^2$	—	—	—	—
		$1,10^3$	—	—	—	—
		$2,10^5$	+	—	—	—
	20	$5,10^2$	+	—	—	—
		$1,10^3$	+	—	—	—
		$2,10^5$	+	—	—	—

+ = croissance de levures; — = milieu de culture stérile; ± = présence rare de levures.

ils ont vieilli d'une façon optimale. Ils possèdent un bouquet de cépage plus accentué, ils sont frais, de bonne maturation en bouteille.

Ces résultats confirment que le traitement permet d'augmenter la qualité des vins, en diminuant le pourcentage de vins altérés et, ainsi, de mieux rentabiliser les entreprises vinicoles.

Nous avons mis l'acide 5-NFA (MIKROSTABIL) à la disposition des chercheurs soviétiques : VALOUYKO et BOURIAN (1975), de l'Institut d'U.R.S.S. pour la viticulture et œnologie « Magaratch » à Yalta, Crimée; ils ont obtenu les mêmes résultats que nous.

L'acide 5-NFA a été étudié par Mme S. LAFON-LAFOURCADE (1974) qui s'est occupée de son dosage. En Bulgarie, BAMBALOV et KOLEVA (1974) ont étudié l'action inhibitrice de l'acide 5-NFA et ont confirmé nos résultats.

TABLEAU 3

Vins stabilisés par Mikrostabil (acide 5-NFA) à la production

Dénomination du vin	SO_2 libre (mg/l)	SO_2 total (mg/l)	Acidité totale (g/l)	Acidité volatile (g/l)	Densité	Alcool % en vol	Alcool (g/l)	Extrait total (g/l)	Extrait sans sucre (g/l)	Teneur en sucre (g/l)	Teneur en Fe (mg/l)	Teneur en Na^+ 5-NFA (mg/l)	Épreuve à température élevée
Klástorné cervené — P-10	10,0	80,0	7,48	0,37	1,0032	11,05	87,2	46,2	24,2	22,0	1,6	6,5	—
Bacchus — P-36. . .	12,0	226,3	7,02	0,34	1,0027	10,9	86,1	44,5	22,9	21,6	9,1	7,5	—
Bacchus — P-39. . .	15,1	210,5	6,65	0,3	1,0034	11,0	86,9	46,6	25,4	21,2	5,6	8,5	—
Müller-Thurgau — P-38	20,6	182,0	6,76	0,3	1,0042	10,6	83,7	47,5	25,1	22,4	8,3	8,7	—

TABLEAU 4

Action de Mikrostabil (acide 5-NFA) sur les caractères sensoriels du vin

N°	Série d'essai	Dose de 5-NFA (mg/l)	Résultat du jugement sensoriel			
			après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois	après 18 mois
1	I	témoin	sain, limpide	sain, sec, limpide	voile	—
2	III	témoin	en refermentation	—	—	—
3	III	5	sain, limpide	sain, limpide	sain, limpide	limpide, harmonieux
4	III	10	—	—	—	plein, harmonieux
5	V	témoin	en refermentation	—	—	—
6	V	5	limpide, souple	limpide, souple	limpide, souple	voile, goût de vieux
7	V	10	—	—	harmonieux, limpide	limpide, maturité de bouteille
8	VI	témoin	en refermentation	—	—	—
9	VI	5	limpide, saveur sucrée aiguë	limpide, saveur sucrée aiguë	harmonieux, plein	voile en refermentation
10	VI	10	—	—	—	maturité de bouteille bouquet de cépage accentué
11	VI	20	—	—	—	—
12	VI	25	limpide, souple	limpide, souple	harmonieux	maturité de bouteille, frais

Effets biochimiques et toxicité de l'acide 5-NFA

Le mécanisme des effets de l'acide 5-nitrofurylacrylique a été étudié par DROBNICA (1976) et MIKO (1976) qui ont conclu que l'acide 3-5-nitro-2-furyl acrylique n'intervient pas dans la structure de la cellule mais inhibe des processus énergétiques de la cellule. DROBNICA (1976) explique l'action de 5-NFA contre les levures par son intervention dans les processus principaux du métabolisme énergétique de la cellule, phosphorylation oxydative et glycolyse. Le mécanisme moléculaire de l'inhibition de la glycolyse est dû à l'élimination des thioenzymes, par saturation de la double liaison du résidu aliphatique. Il suppose que, dans un milieu comme le vin, seule la forme non-dissociée de l'acide 5-NFA pénètre dans les cellules des microorganismes.

La toxicité de l'acide 5-nitrofurylacrylique a été étudiée par KAPELLER *et al.* (1975), VARGOVÁ *et al.*, SZOKOLAYOVÁ *et al.* et par d'autres auteurs. Leur conclusion est que l'acide 5-NFA est une substance non toxique ou très peu toxique, qui n'a pas d'effets mutagènes. En outre, GAŠPERÍK a confirmé que l'acide 5-NFA est une substance typiquement non cancérigène.

On a constaté que les dérivés 5-nitrofuranes s'éliminent du corps humain par voie excrémentielle, dont 99 p. 100 au cours des 24 heures et le reste dans les quelques heures suivantes, ils ne s'accumulent donc pas dans l'organisme.

On a conclu aussi que des doses d'acide 5-NFA même quelque mille fois plus élevées que celles utilisées dans le vin ne produisent pas de changements dans l'ultrastructure des organes humains (foie ou reins) ce qui a été observé à l'ultramicroscope optique.

Les propriétés hygiéniques du 5-NFA ont été étudiées pendant plus de 10 ans par plusieurs instituts Nationaux d'Hygiène de Tchécoslovaquie avec toutes les méthodes existantes et en tenant compte des réglementations internationales les plus sévères. Les documents sont à la disposition des personnes intéressées. Les résultats obtenus par trois instituts indiquent que la DL 50 chez la souris est de 1 000 mg/kg.

Dosage de l'acide 5-NFA

FARKAŠ et POLONSKY (1976) ont élaboré la méthode polarographique de dosage de l'acide 5-nitrofurylacrylique. Le dosage spectrophotométrique à l'aide de l'acide sulfanilique a été élaboré par S. LAFON-LAFOURCADE (1975). VALOUYKO et OGORODNIK (1976) ont utilisé pour le dosage spectrophotométrique la méthode de l'addition de standard.

Méthodes physiques de traitement des vins

Outre les méthodes chimiques de stabilisation du vin contre les troubles microbiologiques, nous nous occupons aussi de nouvelles méthodes physico-chimiques de stabilisation.

Bien que les traitements physiques soient efficaces, on n'a pas réussi à se passer

de certains moyens chimiques, comme par exemple l'anhydride sulfureux parce que certaines souches de levures sont résistantes à des températures élevées (PUT *et al.*, 1976).

Les traitements physiques peuvent être améliorés par exemple par la réduction électrochimique de l'oxygène dissout dans le vin à l'aide d'un dispositif spécial (FARKAŠ et JAKUBÍK 1976) qui, par l'action du courant électrique et de catalyseurs, concentre l'hydrogène à la cathode et fait dégager l'oxygène à l'anode. De cette façon, la teneur du vin en oxygène dissout s'abaisse au-dessous de 1 mg/l; le potentiel redox s'abaisse également. Ce traitement empêche l'évolution des micro-organismes dans le vin et augmente sa stabilité. Les autres composants du vin ne sont pas influencés par ce traitement.

Pour maintenir dans le vin de basses valeurs du potentiel redox et pour empêcher la présence élevée de l'oxygène dissout, il faut utiliser les dispositifs complémentaires à l'embouteillage et au stockage.

— En conclusion on peut constater que pour empêcher l'activité microbiologique dans les vins en bouteilles, il faut procéder aux traitements chimiques, physiques ou bien à leurs combinaisons ce qui permet de diminuer les doses des agents chimiques de stabilisation.

Summary

Wine biological stabilizers

The author has introduced a method of conserving wines with a high residual sugar level by using 3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid (5-NFA) which is sold under the name « Mikrostabil ». 5-NFA is a potent micro-organism inhibitor acting on the yeasts and bacteria in wine must. Its action is evident with any concentration from 10 mg/l. Following many toxicological investigations the Czechoslovakian Ministry of Public Health has authorised the use of 5-NFA for wine stabilitation.

The author has also developped methods for measuring 5-nitrofurylacrylic acid in wine by pology and spectrophotometry as well as procedures for using this substance in wine-making.

Key-words: *Wines — Conservation — 3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid (5-NFA) — Inhibition — Microorganisms — Determination methods.*

Références bibliographiques

BAMBALOV G., 1974. Possibilités de stabilisation biologique des vins par 5-NFA (en bulgare), *Lozarstvo i vinarstvo*, **2**, 27-31.

DROBNICA L., 1976. Régulation des processus biochimiques par différents types de réactifs nucléophiles (en slovaque), *Symposium International Œnologique*, Smolenice.

FARKAŠ J., 1970. *Vinohrad*, **5**.

FARKAŠ J., 1972. Causes de l'arrière-goût et de la formation de casse dans le cas d'emploi d'acide sorbique pour la stabilisation du vin (en slovaque), *Vinohrad*, **7**, 160.

FARKAŠ J., 1973. *Technologie et biochimie du vin* (en slovaque), éd. ALFA, Bratislava, 774 p.

FARKAŠ J., 1973. L'acide 5-NFA comme inhibiteur des fermentations secondaires et des processus microbiologiques dans le vin embouteillé (en slovaque), *Symposium International Œnologique*, Smolenice.

FARKAŠ J., 1976. Ein neues Konservierungsmittel für die Keller-wirtschaft, *Mitteilungen Rebe u. Wein*, **4**, 279-284.

FARKAŠ J. *et al.*, 1976. Acide 5-NFA comme inhibiteur des processus microbiologiques dans les vins (en slovaque), *Rapport final*, Bratislava.

FARKAŠ J., JAKUBÍK D., 1976. Méthode et appareillage d'un traitement des boissons (en slovaque), *Brevet d'invention tchécoslovaque*, n° 173 444.

FARKAŠ J., KOVÁČ J., 1965. Méthode de stabilisation par l'acide 5-nitrofurylacrylique (en slovaque), *Brevet d'invention tchécoslovaque*, n° 144 649.

FARKAŠ J., KOVÁČ J., 1967. Étude sur la stabilisation des vins par l'acide 5-NFA (en tchèque), *Prumysl potravin*, **18**, 267-270.

FARKAŠ J., POLONSKY J., 1976. Polarographische Bestimmung von 5-Nitrofurylakrylsäure im Wein, *Mitteilungen Rebe u. Wein.*

KAPELLER K. *et al.*, 1975. Observations morphologiques de l'action d'acide 5-NFA (en slovaque), *Československá hygiena*, **20**, 3.

KIELHÖFER E., WÜRDIG G., 1963. *Der Deutsche Weinbau*, 1041.

KOVÁČ J., FARKAŠ J., 1964. Préparation de l'acide 5-nitrofurylacrylique (en slovaque), *Brevet d'invention tchécoslovaque*, n° 144 984.

LAFON-LAFOURCADE S., 1974. Un nouvel inhibiteur des levures et des bactéries : 5-NFA, *Ann. Falsif. Exp. Chim.*, **717/718**, 275-283.

LAFON-LAFOURCADE S., 1975. Dosage de l'acide nitro-5-furylacrylique dans les vins blancs, *Conn. Vigne Vin*, **9** (3), 177-183.

LAHO L., MINÁRIK E., NAVARA A., 1970. *Chimie, microbiologie et analyse du vin* (en slovaque), Priroda éd. Bratislava, 426 p.

MIKO F., 1976. Effets biochimiques des dérivés nitrofuranes sur les cellules animales et les mitochondries (en slovaque). *Rapport pour le Centre de Recherches des Entreprises vinicoles de Modra.*

MINÁRIK E., 1962. Emploi des antiseptiques dans les vins en association avec l'anhydride sulfureux en vue du remplacement de ce dernier, *Xe Congrès International, Communication Section Vinification*, Moscou, p. 89-94.

MINÁRIK E., NAVARA A., 1976. *Conférence annuelle sur les levures* (en slovaque), Smolenice.

NEVYDAL J., FARKAŠ J., KOVÁČ J., PUTEJ J., 1965. Préparation des sels de l'acide 5-NFA (en slovaque), *Brevet d'invention tchécoslovaque*, n° 162 379.

PRILLINGER F., 1955, *Mitteilungen*, **5**, 285-292.

PUT H. M. C. *et al.*, 1976. Heath Resistance. Studies on Yeast spp. Causing Spoilage in Soft Drinks, *J. Appl. Bact.*, **40**, 135-152.

RADLER F., 1976. *Bull. O.I.V.*, **545/546**, 629-635.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1966 et 1969. *Traité d'Œnologie*, Tome 1 et 2, Béranger-Dunod, Paris.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1975, *Sciences et Techniques du Vin*, Tome 2, Dunod, Paris.

VALOUYKO G. C. *et al.*, 1976. Utilisation de l'acide 5-NFA pour la stabilisation biologique des vins (en russe), *Rapport de l'Institut de Recherches « MAGARATCH »*, Yalta.

VALOUYKO G. C., BOURIAN N. I., TIOURINA L. V., 1975. Stabilisation biologique des vins par 5-NFA. *Vinodélié i vinograd. SSSR*, **5**, 16-18.

WUCHERPFENNIG K., 1974. Die Verhinderung der Weinsteinausscheidung mit Hilfe der Elektrodialyse. *Dtsch. Weinzeitung*, **26**.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 289

INTERVENTION

Rôle des substances végétales comme agents de la stabilisation biologique des vins et des boissons

L. SHCHERBANOVSKI

Laboratoire de Biochimie végétale du Jardin Botanique d'État de Nikita, Yalta (U.R.S.S.)

Depuis quelques années nous étudions les propriétés antibiotiques des plantes et des substances d'origine végétale envers les levures et les ferments lactiques. Le but principal de ces recherches est d'établir les rapports réciproques entre les diverses espèces de plantes et ces microorganismes.

Parmi les substances végétales, dont nous avons étudié le pouvoir antimicrobien, nous remarquons la plumbagine et la juglone et les recommandons en qualité d'agents de stabilisation des vins.

La plumbagine (méthyl-2, hydroxy-5, naphthoquinone-1-4) peut être extraite à l'état pur (cristal) de certaines espèces de plantes suivant la méthode que nous avons élaborée dans notre laboratoire (Brevet d'invention U.R.S.S. N° 351552, Cl. A61k 27/14).

La juglone (hydroxy-5, naphthoquinone-1-4) peut être extraite de l'exocarpe des fruits du noyer.

Nous avons étudié le mode d'emploi de ces substances en qualité d'agents de stabilisation des boissons gazeuses non alcooliques. Suivant les boissons et le nombre des microorganismes qu'elles contiennent, la plumbagine et la juglone assurent leur stabilité à la concentration 1 à 3 mg/l. L'emploi de la plumbagine et de la juglone en qualité d'agents de stabilisation biologique est breveté en U.R.S.S. (N° 220923, 6d3; N° 322176, C 23/3/34) et autorisé par le Ministère de la Santé Publique.

Nous avons également breveté en U.R.S.S. l'emploi de la plumbagine et de la juglone en qualité d'antibiotiques des pellicules, destinés à prévenir l'oxydation et l'altération d'origine microbienne des vins et autres liquides hydrophyles (Brevet d'invention U.R.S.S., N° 460294, C12h1/20).

Pour prendre connaissance de ces brevets d'invention on peut s'adresser à l'Académie des sciences agricoles (« VASKNIL »), Bolchoi Karitonevskii, N° 21, Moscou, U.R.S.S., 107814.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 291

INTERVENTION

Sur la toxicité de l'acide 5-nitrofurylacrylique (5 NFA)

J. MASQUELIER

Laboratoire des Matières Médicales,
Université de Bordeaux II (France)

Il nous semble peu probable que le 5-NFA puisse un jour être admis comme additif alimentaire par les instances de la C.E.E. pour les raisons suivantes :

Toxicité aiguë

Nous avons effectué des essais de toxicité aiguë sur la souris, par voie orale. La DL 50 se situe aux environs de 200 mg /kg. A titre de comparaison, cette toxicité est celle d'un barbiturique, c'est-à-dire un médicament figurant au tableau C et ne pouvant être délivré que sur prescription médicale.

Action mutagène

Les dérivés du 5-Nitrofurane, utilisés au Japon dans les conserves de poisson, ont été interdits à la suite des travaux de YAHAGI et SUGIMURA démontrant leur action mutagène.

Inhibition des déshydrogénases

Les médicaments appartenant au groupe du Nitrofurane (Furazolidone, Nitrofurantoïne...) bloquent l'acétaldéhyde-déshydrogénase. Si l'on consomme de l'alcool au cours du traitement, on risque de provoquer des troubles de type Antabuse (dus à l'accumulation de l'éthanal) caractérisés par de la tachycardie, de la migraine, une douleur de type angine de poitrine, des nausées et des syncopes. Les firmes pharmaceutiques proscrivent la consommation d'alcool en raison de ces troubles qui peuvent, aux fortes doses, entraîner la mort. Il semble donc tout à fait contre-indiqué d'introduire de telles molécules dans une boisson alcoolisée.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 293-314

Les problèmes théoriques et pratiques de la stabilisation biologique des vins par les procédés thermiques

P. BIDAN, C. DUBOIS et G. DOUTSIAS

Station de Technologie végétale, I.N.R.A
Centre de Recherches de Dijon,
21034 Dijon Cedex (France)

Résumé

Parmi les procédés physiques de stabilisation biologique des vins, l'emploi de la chaleur est très ancien. La pasteurisation du vin a longtemps été une technique basée sur l'empirisme, aussi les utilisateurs avaient-ils tendance à prendre une trop grande marge de sécurité. Afin d'utiliser correctement cette technique, il est nécessaire de fixer les couples de paramètres temps-température minimaux.

Une méthode d'étude de la thermorésistance des germes non sporulés par réacteur a été utilisée. Elle nous a permis de tracer les courbes de survie-temps de différentes souches de levures et de bactéries lactiques. Différents types de courbes ont été obtenus. La thermorésistance des levures et des bactéries lactiques est assez voisine mais variable suivant les conditions du milieu.

En effet, différents facteurs interviennent sur la destruction thermique en plus du temps et de la température. Plus la population microbienne du vin traité est élevée, plus les paramètres de pasteurisation sont élevés, il est donc indispensable de traiter ces vins afin de les appauvrir en germes. L'âge de la culture intervient également : les germes en phase exponentielle sont moins résistants que les germes en phase stationnaire. A une température donnée, le temps de destruction d'une population microbienne déterminée varie en fonction du degré alcoolique, selon une loi exponentielle aussi bien pour les levures que pour les lactobacilles. Par contre, la présence de sucre exerce un effet protecteur sur les germes; les paramètres de pasteurisation, dans le cas des vins doux, devront être plus élevés. D'autres facteurs, tels que le pH et la teneur en anhydride sulfureux exercent également une influence.

Des données obtenues expérimentalement et de celles trouvées en bibliographie, il a été déduit une table d'unités de pasteurisation (U.P.) applicable aux vins et il est donné le nombre d'U.P. nécessaire pour assurer une stabilité efficace des vins par la chaleur (0,2 à 10 U.P.).

Le contrôle de la pasteurisation est important et pose le problème de la numération des très faibles populations.

Mots clés : *Vins — Stabilisation biologique — Procédés thermiques — Germes non sporulés — Courbes de survie — Paramètres de pasteurisation.*

Introduction

Un des moyens physiques utilisés pour éviter des altérations dans les vins est la pasteurisation. Quoique ce procédé soit très ancien (PASTEUR, 1873), on connaît encore mal la théorie de la destruction des germes par la chaleur dans le milieu vin. Devant l'absence de données théoriques de base, on s'aperçoit que l'industrie a généralement pris de grandes marges de sécurité dans le choix des paramètres de pasteurisation. L'étude théorique de la thermorésistance des microorganismes et une meilleure connaissance des facteurs intervenant sur cette thermorésistance en milieu vin devrait permettre d'utiliser plus rationnellement la pasteurisation et d'éviter un gaspillage d'énergie tout en diminuant les risques d'altération du produit au cours du processus industriel.

Rappel des données théoriques sur la destruction thermique des microorganismes

En thermobactériologie, la technique a précédé la science. Les données théoriques de la thermorésistance des microorganismes seront rappelées brièvement, elles ont été exposées maintes fois (BIGELOW et ESTY, 1920; BIGELOW, 1921; SCHMIDT, 1957; STUMBO, 1973) et particulièrement pour les vins (MORFAUX, 1973; DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON, 1977). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la mort des microorganismes par la chaleur (STUMBO, 1973).

La thermorésistance d'une cellule ou d'une population microbienne se définit généralement par le traitement thermique maximal que la cellule ou la population microbienne est susceptible de supporter (BROWN et MELLING, 1971). Le seul critère pratique de mort des cellules retenu est la perte de l'aptitude à donner une descendance.

En ce qui concerne l'évaluation de l'effet des traitements thermiques, deux méthodes sont utilisées. La première, très proche de la définition de la thermorésistance, consiste à mesurer après un traitement thermique donné, la probabilité d'une nouvelle croissance dans un volume donné d'une suspension homogène placée dans des conditions d'environnement données. Il s'agit d'une analyse de type tout ou rien qui nous permet d'évaluer le nombre le plus probable de survivants. La seconde consiste à mesurer, directement en milieu solide, la survie d'une population microbienne donnée après traitement thermique donné dans des conditions données. Il s'agit d'une analyse de type fréquence de survivants.

Dans ce dernier cas, on trace une courbe de survie-temps (fig. 1); ces courbes ont des formes diverses, mais on utilise souvent une loi exponentielle ou première loi de la théorie classique de la thermorésistance. Le nombre de microorganismes survivants au traitement thermique est inversement proportionnel au temps et cela dans une relation logarithmique. Le temps de destruction thermique à une température donnée $= D_T$ (log No — log N), dans lequel D_T = temps de réduction décimale, temps de chauffage nécessaire à une température donnée pour tuer 90 p. 100 de la population microbienne ou pour que la courbe de survie-temps franchisse un cycle logarithmique. C'est un paramètre commode pour la comparaison des thermorésistances des différentes souches microbiennes, ou d'une même

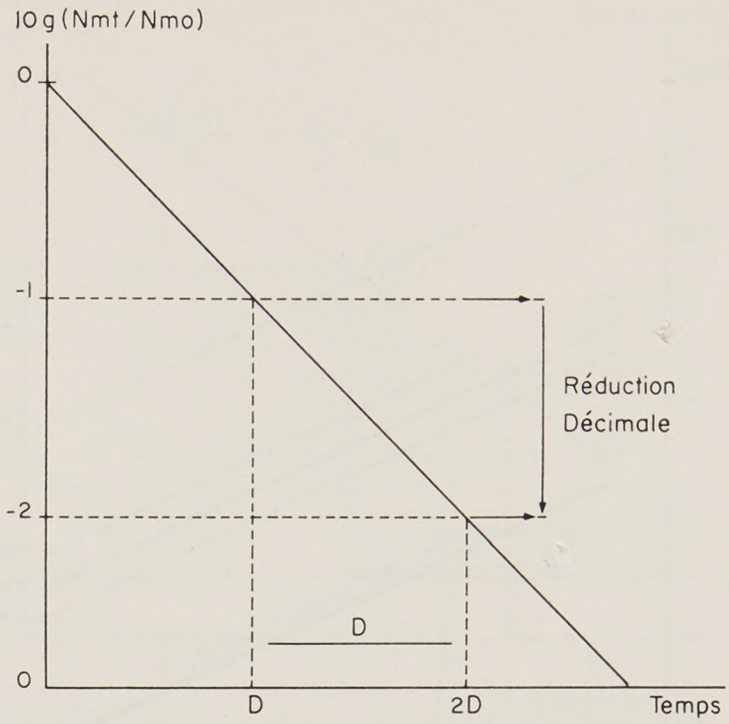


FIG. 1. — *Courbe de survie-temps à température constante « Loi exponentielle ».*

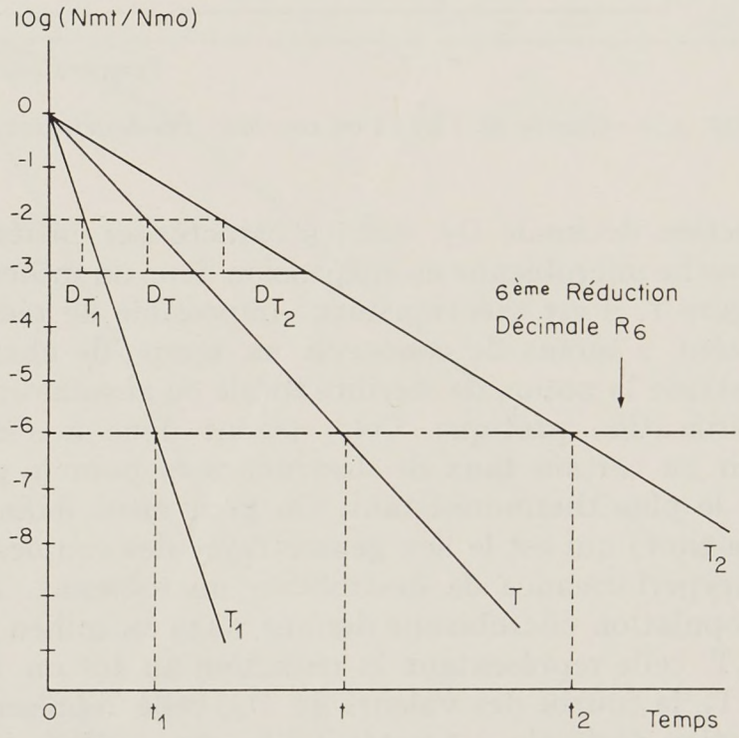


FIG. 2. — *Différentes courbes de survie-temps suivant la température.*

$$\log \frac{Nmt}{Nmo} = \frac{t}{Dt}$$

souche selon les conditions du milieu. On peut tracer la courbe des valeurs de D_T à partir de différentes courbes de survie-temps (fig. 2), où les couples temps, température (t, T) exercent le même effet biologique (fig. 3). En coordonnée semilogarithmique cette droite a une pente $= -\frac{1}{Z}$.

Z est donc l'élévation de température nécessaire pour réduire la constante de temps D_T au 10e de sa valeur. La connaissance du paramètre Z et d'une valeur

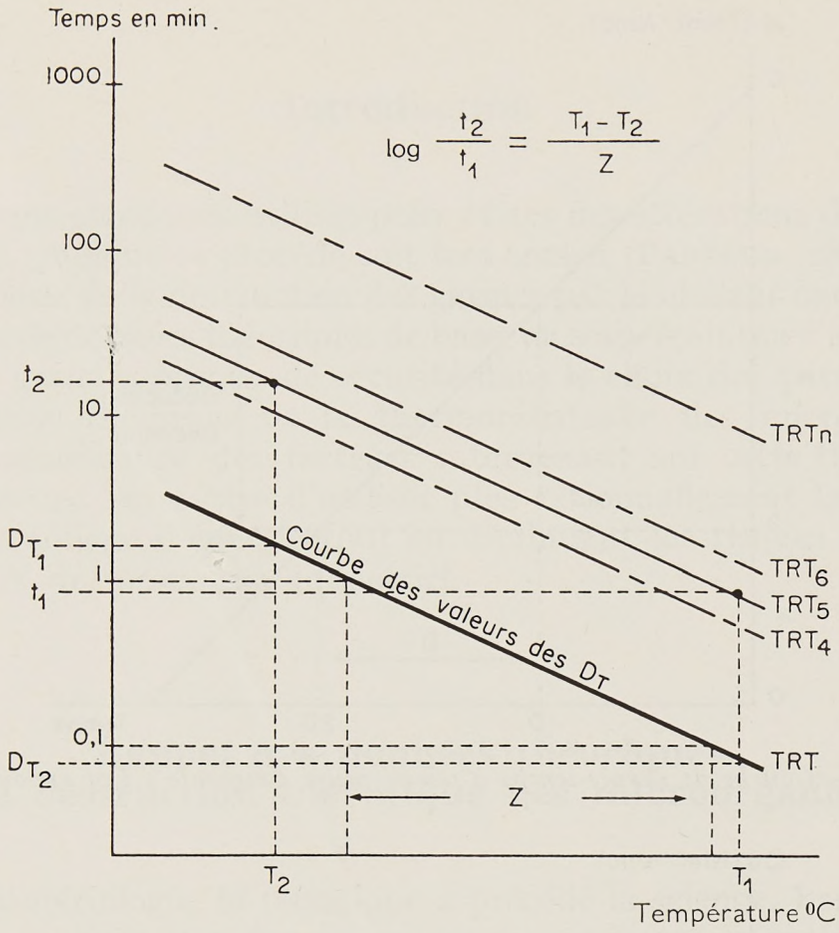


FIG. 3. — *Courbe de TRITi ou courbes « iso-destruction ».*

du temps de réduction décimale D_T, suffit à caractériser entièrement la thermorésistance d'une souche microbienne en suspension dans un milieu bien défini.

D'après la figure 1, il est théoriquement impossible de réduire le nombre de survivants N_n à zéro, à moins de concevoir un temps de chauffage infini. Cela exclut donc en pratique la notion de stérilité totale ou absolue et on lui substitue la conception de stérilisation pratique. Cela revient donc à s'imposer une norme qui est de garantir un certain taux de destruction *n* pour le germe d'altération qui se révèle être le plus thermorésistant. On peut aussi définir la courbe TRT (thermal reduction time) qui est le lieu géométrique des couples (*t*, T) qui accomplissent une même performance de destruction microbienne. A chaque taux de réduction d'une population microbienne donnée, dans un milieu donné, correspond une courbe de TRT; celle représentant la réduction au 10e ou 1re réduction décimale est notée TRT_1, la courbe des valeurs de D_T, celle représentant la réduction à 10^{-5} (ou 5e réduction décimale) est notée TRT_5, etc..., TRT_n (fig. 3).

Un autre paramètre pratique peut être défini : la valeur (P) d'un traitement thermique. C'est le temps nécessaire pour réaliser un taux de destruction *n* sur le germe test à la température de référence. En pasteurisation, on a également défini l'effet physiologique provoqué dans un milieu considéré pour un germe défini par le maintien pendant une minute à la température de T°. On définit ainsi l'unité de pasteurisation (U P) qui est l'effet physiologique obtenu dans un milieu considéré par le maintien pendant une minute à une température donnée (fig. 4). En brasserie, la température de référence a été de 60°. En œnologie nous verrons qu'en choisissant cette température on aboutit à des chiffres très faibles.

En général, pour une température n'excédant pas 100°, deux types de mesures sont utilisés : ou des suspensions de germes microbiens sont mises dans un bain-

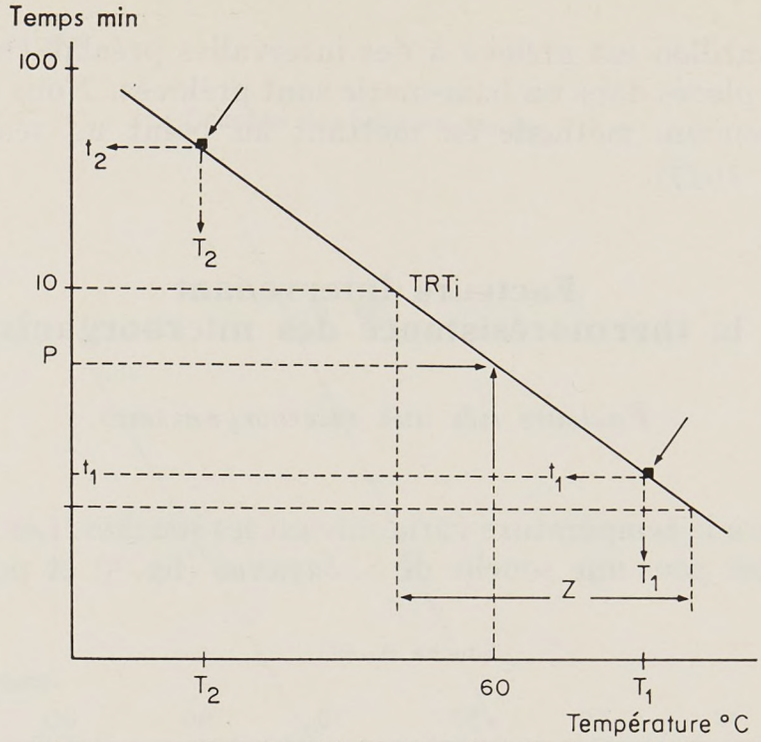


FIG. 4. — *Courbe TRTi pour le calcul des UP.*

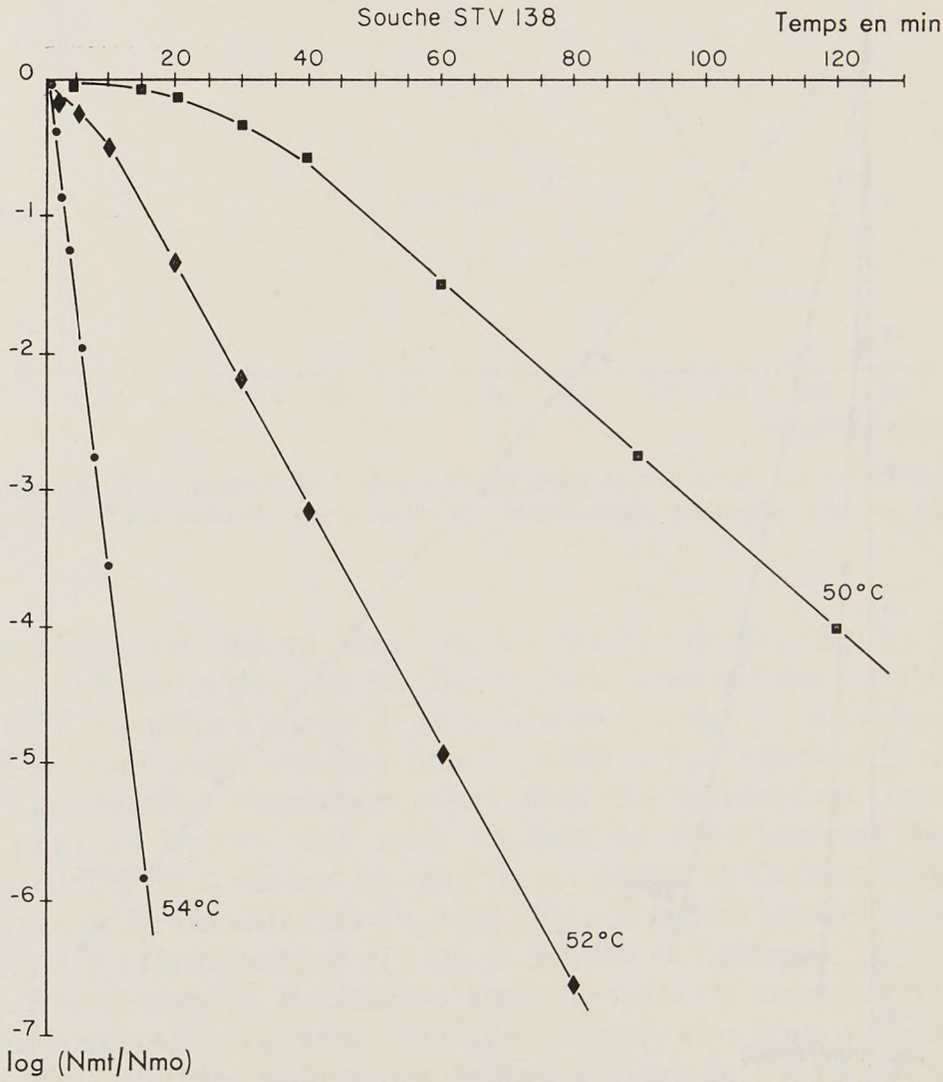


FIG. 5. — *Courbes de survie-temps d'une souche de* S. bayanus *(STV 138) obtenues à différentes températures (50, 52, 54 °C) dans les conditions suivantes : milieu de récolte M. W liquide à la température de 28 °C; Age de la culture : phase stationnaire (96 h). Milieu d'essai : tampon phosphate pH 5,4; Nombre initial Nmo = 0,85-1.10⁷ /ml; Numération sur milieu M W gélosé après incubation à 28 °C.*

marie et un échantillon est prélevé à des intervalles préalablement fixés, ou des tubes individuels placés dans un bain-marie sont prélevés. Nous avons utilisé dans nos essais, la première méthode en mettant au point un réacteur (DOUTSIAS, 1974; DOUTSIAS, 1977).

Facteurs intervenant sur la thermorésistance des microorganismes

Facteurs liés aux microorganismes

Les souches

La résistance à la température varie suivant les souches. Les courbes de survie-temps sont données pour une souche de *S. bayanus* (fig. 5) et pour une souche de

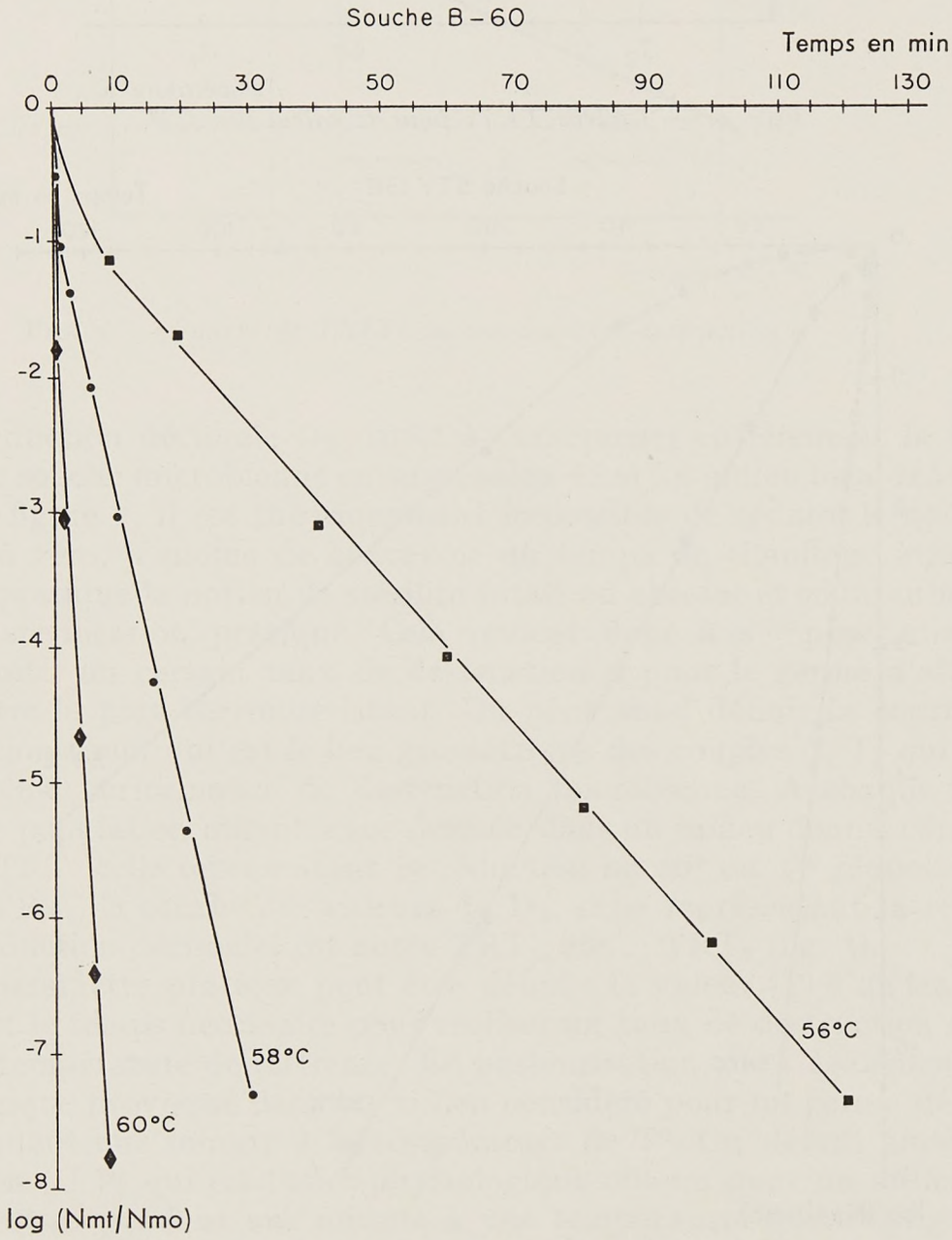


FIG. 6. — *Courbes de survie-temps d'une souche de* L. plantarum (*B 60*) *obtenues à différentes températures* (*56, 58, 60 °C*) *dans les conditions suivantes : milieu de récolte : LDP liquide à la température de 28° C. Age de la culture : phase stationnaire* (*96 h*). *Milieu d'essai : tampon phosphate pH 6. Nombre initial Nmo = 0,84 — 1,2.10⁸ /ml. Numération sur milieu LDP gélosé après incubation à 28 °C.*

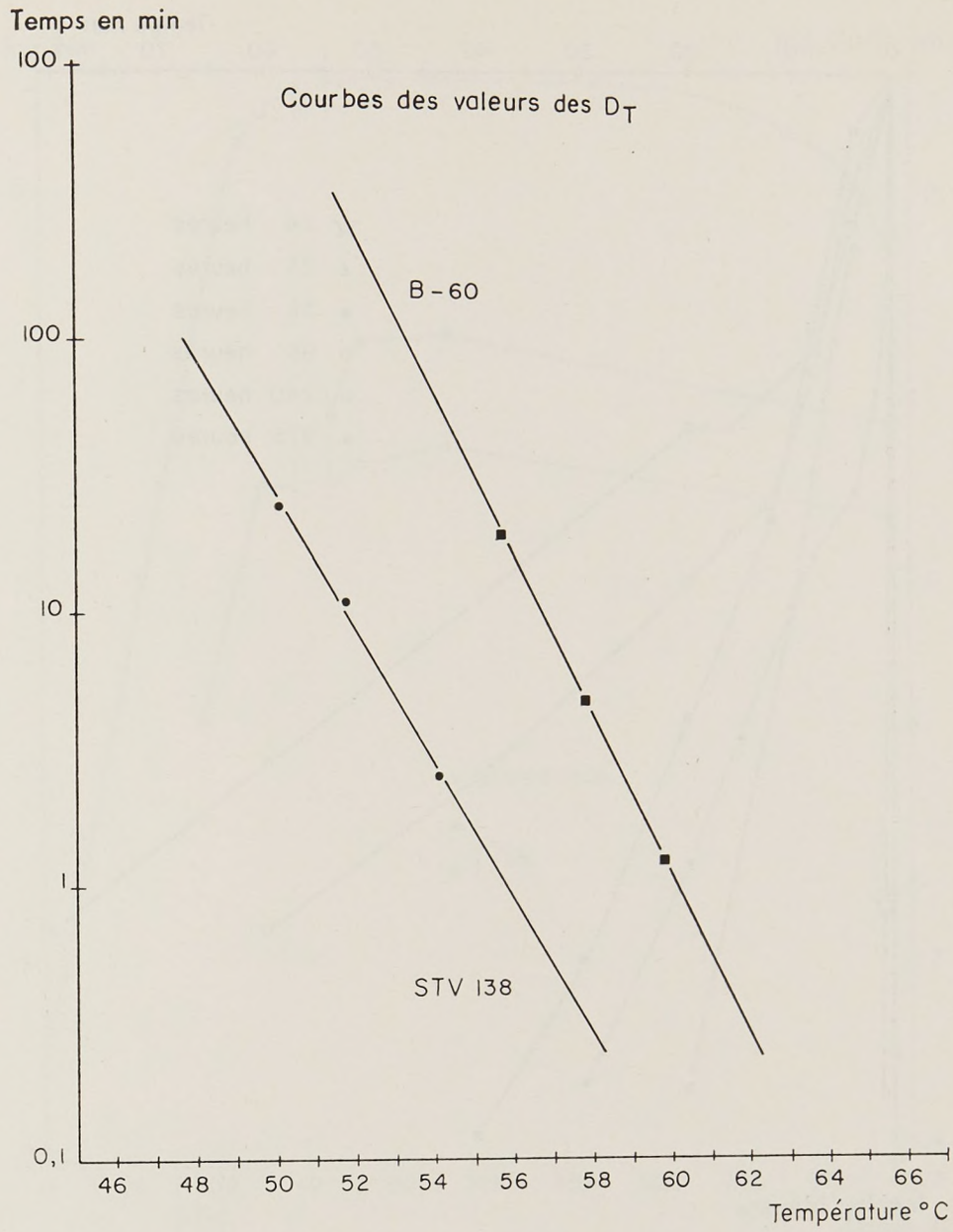


FIG. 7. — *Courbes de D_T. Courbes des valeurs de D_T pour la souche de levure STV 138 et pour la souche de bactérie B 60 déduites des courbes de survie-temps présentées sur les figures 5 et 6*

Lactobacillus plantarum (fig. 6) ainsi que les courbes de D_T (fig. 8). Les courbes de survie-temps obtenues pour les bacilles et les levures ont des formes différentes. Les valeurs de Z calculées à partir de la courbe de D_T (fig. 7), sont données dans le tableau 1. Elles sont assez voisines pour *Saccharomyces bayanus* et *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus plantarum* étant plus thermorésistant que la levure. Ces valeurs pour les levures sont assez voisines de celles trouvées dans la bibliographie : les valeurs de Z varient en effet de 3,2 (AREF et CRUESS, 1931) à 3, 23-4, 34 pour DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON, 1977. Pour d'autres levures les chiffres de Z varient de 3,3 à 9,0 (MURDOCK *et al.*, 1953; ANAND et LEISRAM, 1952; VAN UDEN *et al.*, 1968; STEVENSON et RICHARDS, 1976; DOUTSIAS, 1974, 1977).

En ce qui concerne les bactéries lactiques dans les vins nous n'avons pas trouvé de référence, dans d'autres milieux les chiffres varient de 3 à 10 (MURDOCK *et al.*, 1953; MORFAUX et BIDAN, 1965; FERNANDEZ DIEZ *et al.*, 1967; GONZALEZ PELLISO *et al.*, 1975; PUT *et al.*, 1976; DOUTSIAS, 1974, 1977). DEL VECCHIO *et al.*, (1951) pour les germes trouvés dans la bière, ont effectué des calculs de destruction thermique avec une valeur de Z = 7 °C. Pour des bactéries non sporulées, telles que *Esche-*

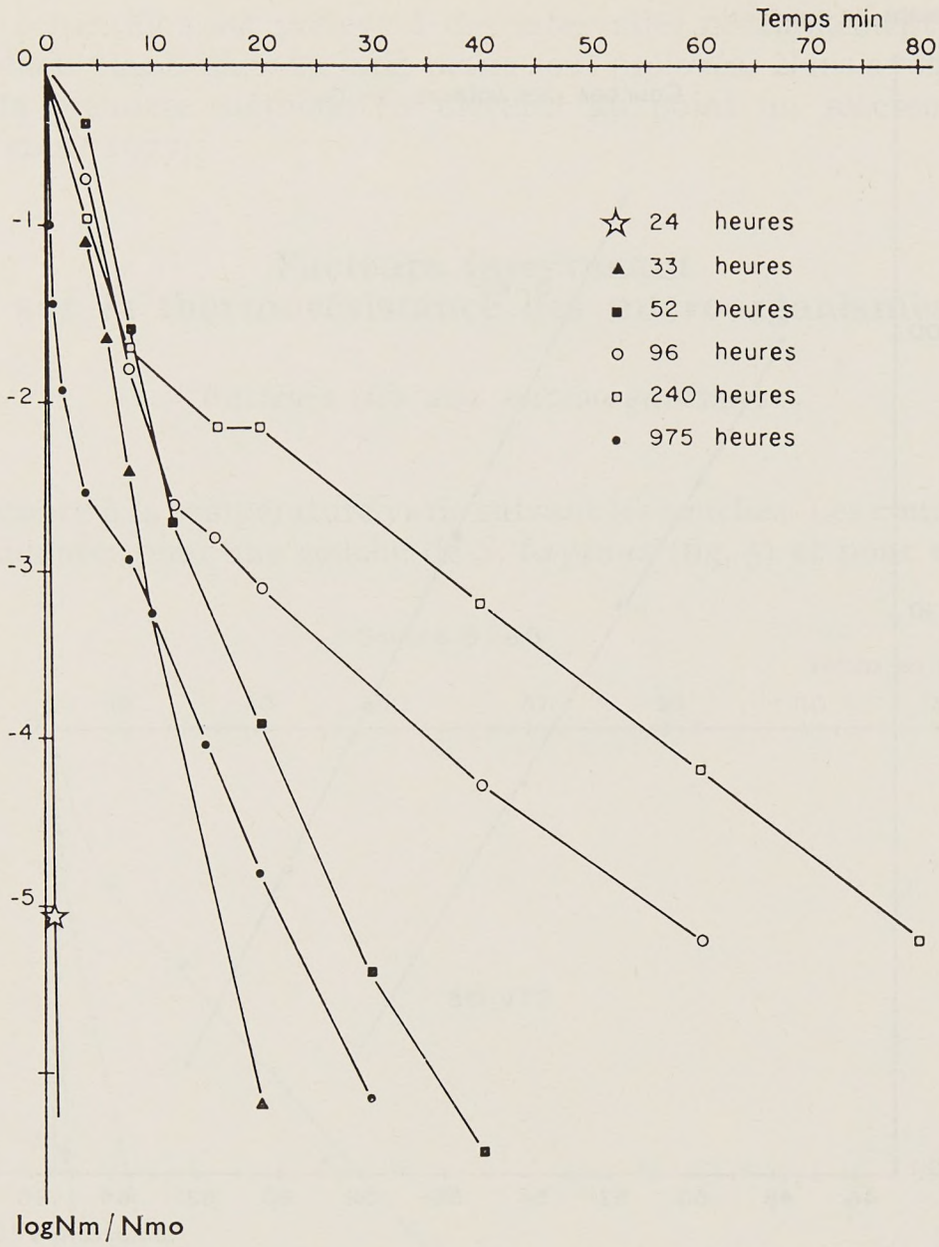


FIG. 8. — *Courbes de survie-temps d'une souche de* P. polymorpha (*X-100, 54*), *obtenues à la température de 55 °C avec des cultures d'âge différent (24, 33, 52, 96, 240, 975 h), dans les conditions suivantes : milieu de récolte : MW liquide à la température de 28 °C ; milieu d'essai : tampon phosphate pH5. Nombre initial : Nmo = 0,3 — 1,9.10⁷ germes/ml. Numération : sur milieu MW gélosé après incubation à 28 °C.*

richia, Streptococcus, Salmonella, Corynebacterium, Brucella, Staphylococcus, Micrococcus, les valeurs de Z varient de 2,9 à 8 (DOUTSIAS, 1977; CORRY, 1974; ELLIKER et FRAZIER, 1938; GIBSON, 1973; WHITE, 1953).

Age de la culture

La figure 8 donne pour une souche de levure *P. polymorpha* les courbes de survie-temps obtenues à 55° à des âges de culture différents. Les cellules en phase exponentielle (moins de 24 h) sont très sensibles à la température. Au début de la phase stationnaire, la résistance de la population de levure augmente. Ensuite cette résistance reste constante bien que le niveau de la population survivante soit plus élevé. La thermorésistance de cette souche diminue lorsque les cellules sont en phase de déclin. Pour cette souche nous remarquons que les courbes de survie-

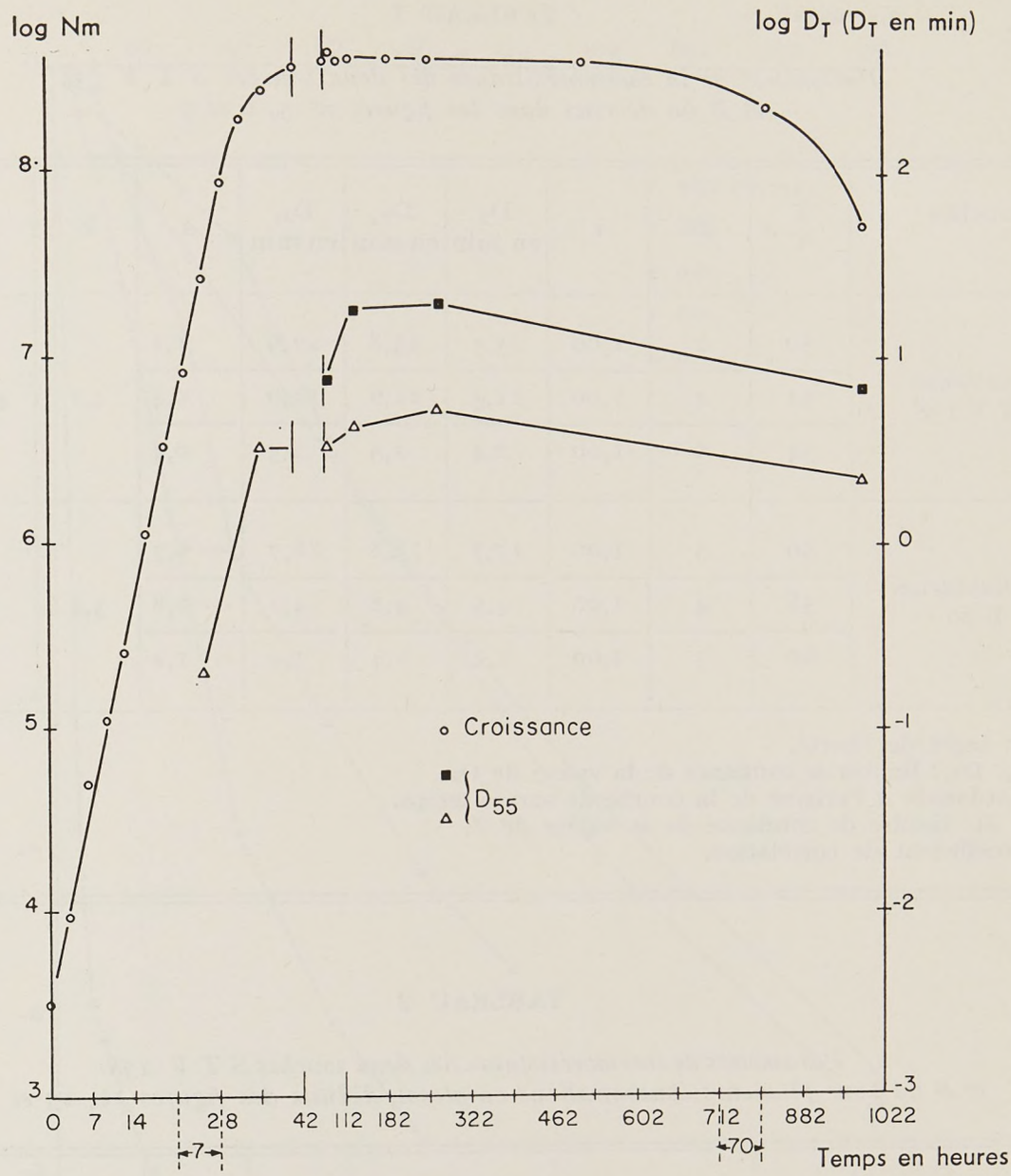


FIG. 9. — *Influence de l'âge de la culture sur la thermorésistance à 55 °C (D_{55}) d'une souche de* P. polymorpha *(X-100, 54). Conditions : croissance observée dans le milieu MW liquide sous condition d'aération maximale et à la température de 28 °C. Valeurs de D_{55} calculées sur les parties rectilignes des courbes de survie-temps de la figure n° 8 (Δ) D_{55} calculée d'après la pente de la première partie de la courbe (■) D_{55} calculée d'après la pente de la deuxième partie de la courbe.*

temps se composent de deux exponentielles. Nous constatons sur la figure 9 que les deux séries de valeurs de D55 varient dans le même sens, mais que le phénomène est plus accentué pour la deuxième partie de la courbe.

La figure 11 présente la courbe de croissance d'une souche de *Lactobacillus plantarum* et la figure 10 nous montre les courbes de survie à 52°. Ces courbes ont une allure générale de type sigmoïde. La figure 11 montre que la résistance des lactobacilles est plus faible lorsque les cellules sont récoltées avant la fin de la phase exponentielle (12 h). La résistance augmente avec l'âge de la culture jusqu'à 96 heures puis reste stable jusqu'à 420 heures au moins.

Ces résultats confirment ceux de ELLIKER et FRAZIER (1938) obtenus sur *E. coli*, et WHITE (1953) sur *S. faecalis*. DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON (1977) ont montré que pour *S. bayanus*, la D40 passe de 2,40 min pour une culture de 1 jour à 21,9 min pour une culture de 14 jours.

TABLEAU I

Paramètres de la thermorésistance des deux souches S T V 138 et B 60 décrites dans les figures n° 5, 6 et 7

Souches	T °C	*d.l*	*r*	D_T en min	D_{Ts} en min	D_{Ti} en min	*a*	Z	Zs	Zi
S. bayanus S T V 138	50	2	1,00	23,3	23,8	22,9	1,1	4,1	41,3	2,1
	52	4	1,00	11,3	11,6	11,0	0,4			
	54	6	1,00	2,4	2,5	2,3	0,4			
L. plantarum B 60	56	5	1,00	17,7	18,8	16,7	— 0,7	3,4	3,6	3,3
	58	4	1,00	4,5	4,8	4,2	— 0,8			
	60	3	1,00	1,2	1,4	1,0	— 1,2			

d.l: degré de liberté.
D_{Ts}, D_{Ti} : limites de confiance de la valeur de D_T.
a: ordonnée à l'origine de la courbe de survie-temps.
Zs, Zi: limites de confiance de la valeur de Z.
r: coefficient de corrélation.

TABLEAU 2

Paramètres de thermorésistance des deux souches S T V 138 et B 60 pour plusieurs concentrations en alcool, déduits des figures 12, 13 et 14

Souche	° alcool	*d.l*	*r*	D_T en min	D_{Ts} en min	D_{Ti} en min	*a*	*d* en d°	*ds* en d°	*di* en d°
S. bayanus (S T V 138)	8,5	5	1,00	3,4	3,6	3,3	0,0	6,1	6,5	5,8
	10	4	1,00	2,0	2,2	1,9	— 0,1			
	12	3	1,00	0,9	1,0	0,9	0,0			
	15	2	1,00	0,3	0,4	0,2	— 0,2			
L. plantarum (B 60)	10	6	1,00	15,5	16,4	14,6	0,1	31,	4,7	2,4
	12	7	0,99	4,6	5,1	4,2	0,0			
	15	2	0,99	0,4	1,2	0,2	— 0,3			

d.l: degré de liberté.
r: coefficient de corrélation.
D_{Ti}, D_{Ts} : limites de confiance de la valeur de D_T.
a: ordonnée à l'origine de la courbe de survie-temps.
d: inverse de la pente de la courbe L, $D_T = f$ (d^0 alcool).

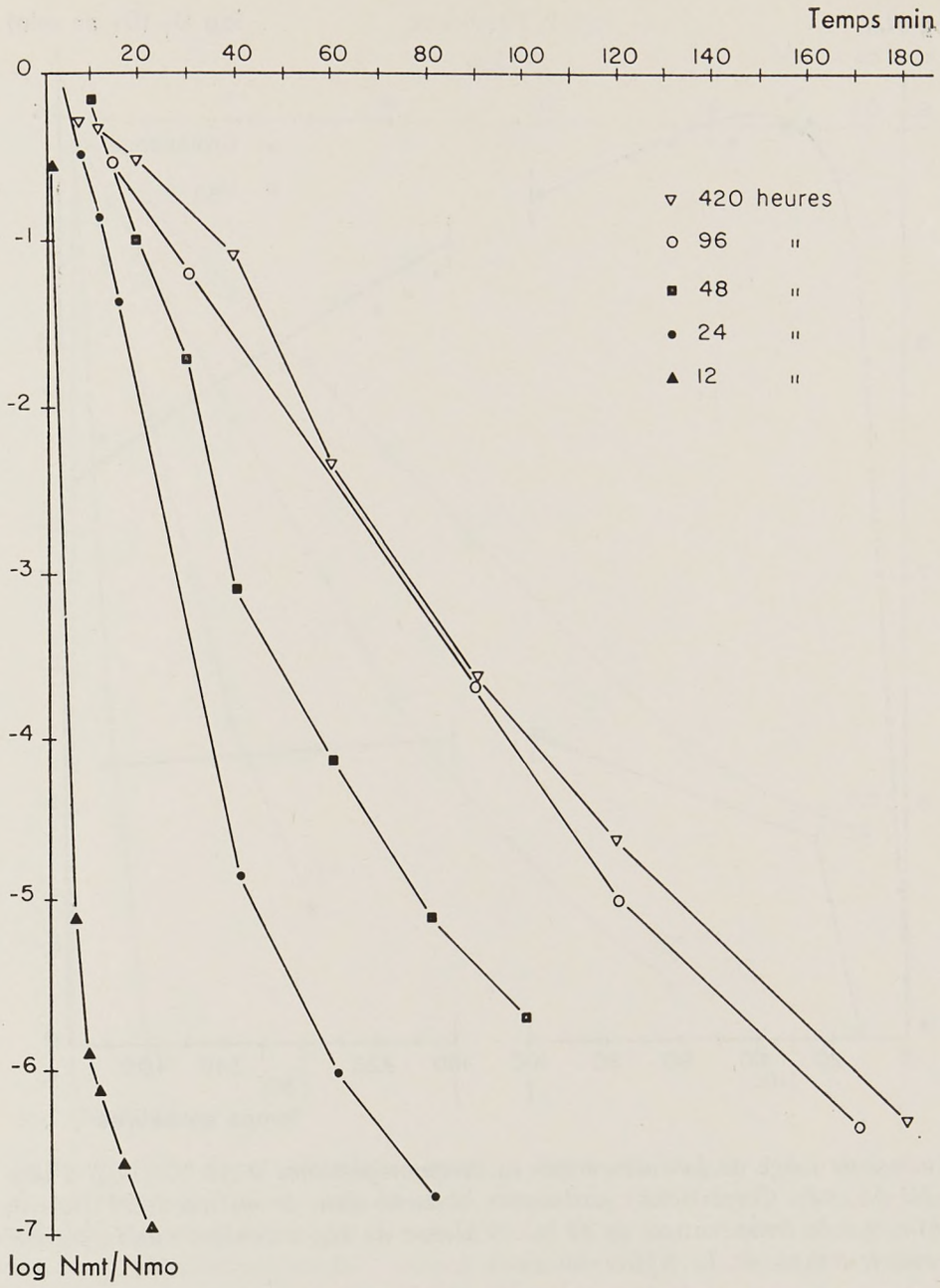


FIG. 10. — *Courbes de survie-temps d'une souche de* L. plantarum *(B-60, 54) obtenues à la température de 52 °C avec des cultures d'âge différent (12, 24, 48, 96, 420 h), dans les conditions suivantes : milieu d'essai : tampon phosphate pH6. Nombre initial : Nmo = 0,2 — 9,4.10⁷ germes/ml. Numération : sur milieu LDP gélosé après incubation à 28 °C.*

Influence de la température de croissance

D'après SCHMIDT (1957) et STUMBO (1973) pour les germes non sporulés, il est généralement trouvé que plus le germe croît à une température voisine de sa température optimale de croissance, et plus sa résistance à la chaleur est élevée.

Nature du milieu dans lequel les germes ont poussé

Il n'y a que quelques études publiées sur les germes sporulés. En ce qui concerne ces germes, certaines substances à certaines teneurs seraient favorables à la thermorésistance de ces germes, notamment les ions Fe, Ca et Mn et certains types de peptones.

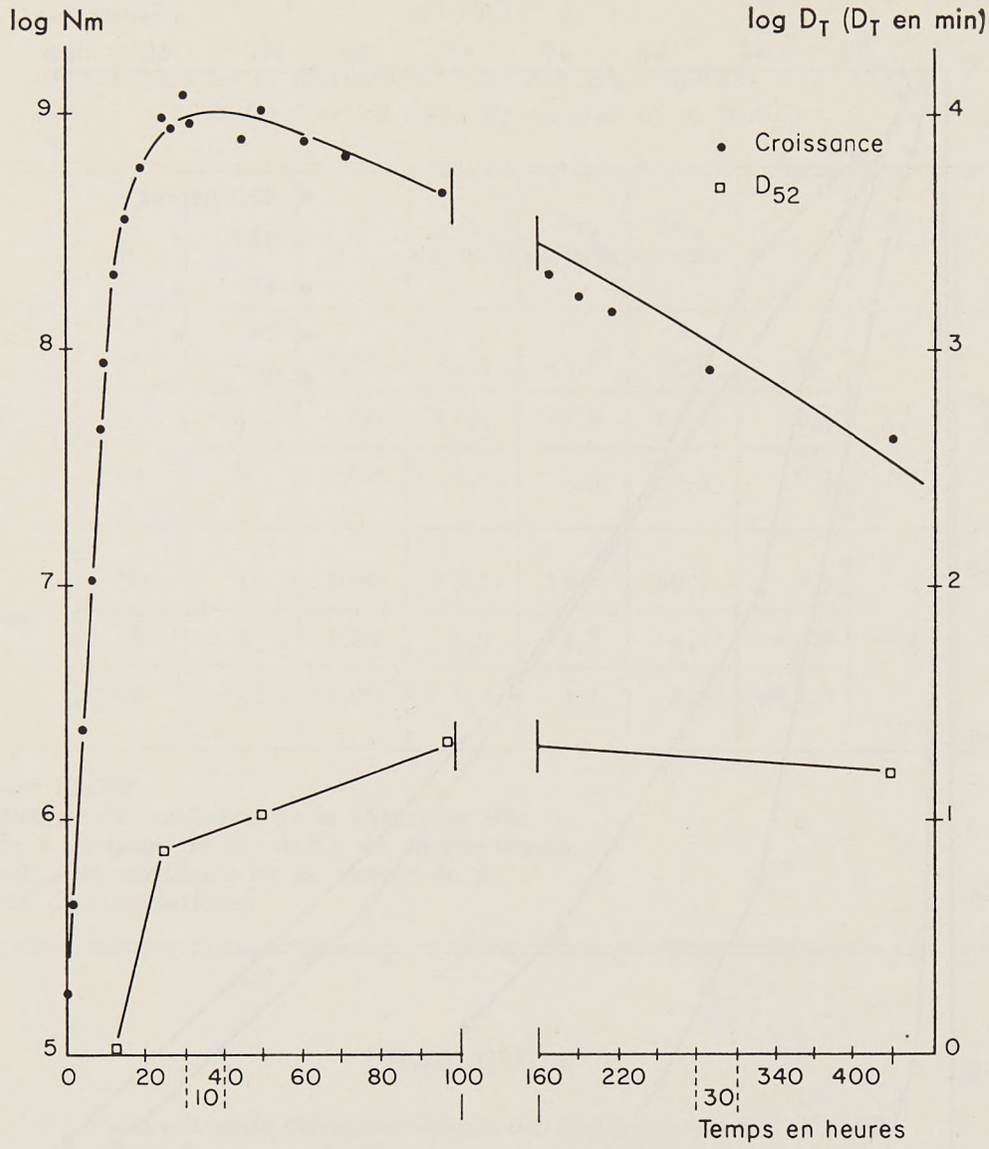


FIG. 11. — *Influence de l'âge de la culture sur la thermorésistance à 52 °C (D_{52}) d'une souche de* L. plantarum *(B-60, 54). Conditions : croissance obtenue dans le milieu LDP liquide en condition microaérophile et à la température de 28 °C. Valeurs de D_{52} calculées sur la partie rectiligne des courbes de survie-temps de la figure n° 10.*

Cultures en amas

Les cellules en amas tel que cela peut se rencontrer dans le genre Leuconostoc donnent des courbes de thermorésistance concaves avec une concavité tournée dans le sens d'un accroissement des temps.

Les souches de Leuconostoc que nous avons essayées ont toutefois présenté une thermorésistance inférieure à celles des *Lactobacillus*.

Facteurs liés au milieu de traitement

Alcool

La teneur en éthanol du milieu est très importante pour la thermorésistance des microorganismes. Cela a déjà été montré par les travaux de BAILLOT D'ESTIVAUX (1958), JACOB *et al.* (1964), SPLITTSTOESSER *et al.* (1975).

Les figures 12 pour *S. bayanus* et 13 pour *L. plantarum* donnent l'influence de

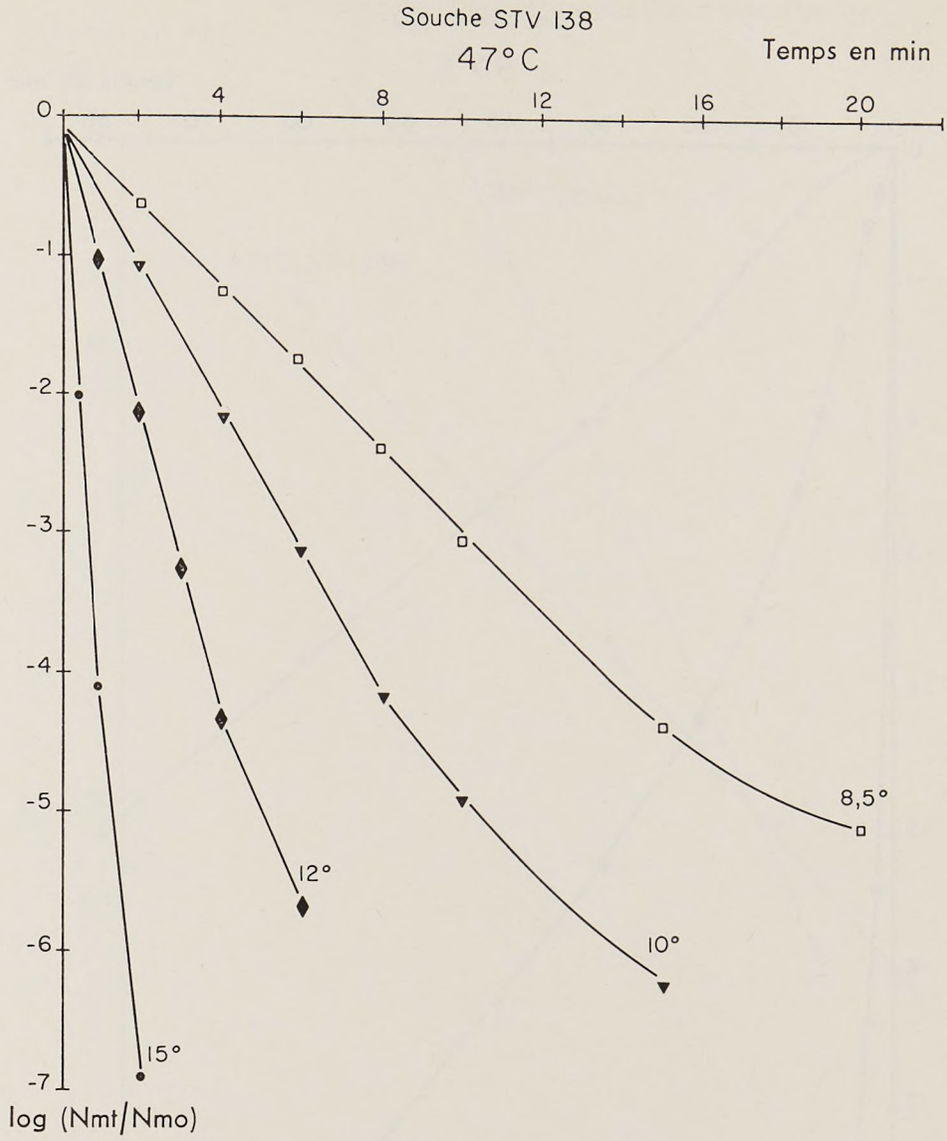


FIG. 12. — *Influence du degré alcoolique sur la thermorésistance d'une souche de levure. Courbes de survie-temps d'une souche de* S. bayanus (*STV 138*) *obtenues dans des tampons phosphate à pH 5,4 avec différents degrés d'alcool (8,5, 10, 12, 15° alcool) à la température de 47 °C, dans les conditions suivantes : milieu de récolte : M.W liquide à la température de 28 °C. Age de la culture : phase stationnaire (96 h). Nombre initial Nmo = 0,9 — 1,3.10⁷ /ml. Numération sur MW gélosé après incubation à 28 °C.*

quelques teneurs en alcool dans un milieu tampon, sur la thermorésistance de ces souches.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2 et les courbes de D_T sont tracées sur la figure 14.

Nous constatons que plus la teneur en alcool est élevée plus la thermorésistance des souches est faible et qu'il semble y avoir une relation exponentielle entre le temps de destruction et la teneur en alcool aussi bien pour les levures que pour les bactéries lactiques. Les valeurs de D 47 varient de 3,4 min pour 8,5° d'alcool à 0,3 min pour 15° d'alcool pour *S. bayanus* et D 45 varient de 15,5 min pour 10°, à 0,4 min pour 15° pour *L. plantarum*.

SPLITTSTOESSER *et al.* (1975), ont trouvé pour une *Saccharomyces* formant un voile une D51 = 16 min dans un jus de raisin alors que D51 = 0,82 dans le même jus additionné de 10 p. 100 d'alcool et de 0,30 dans le même jus additionné de 12 p. 100 d'alcool.

DEVÈZE et RIBÉREAU-GAYON (1977) pour *S. bayanus* ont trouvé que, dans le

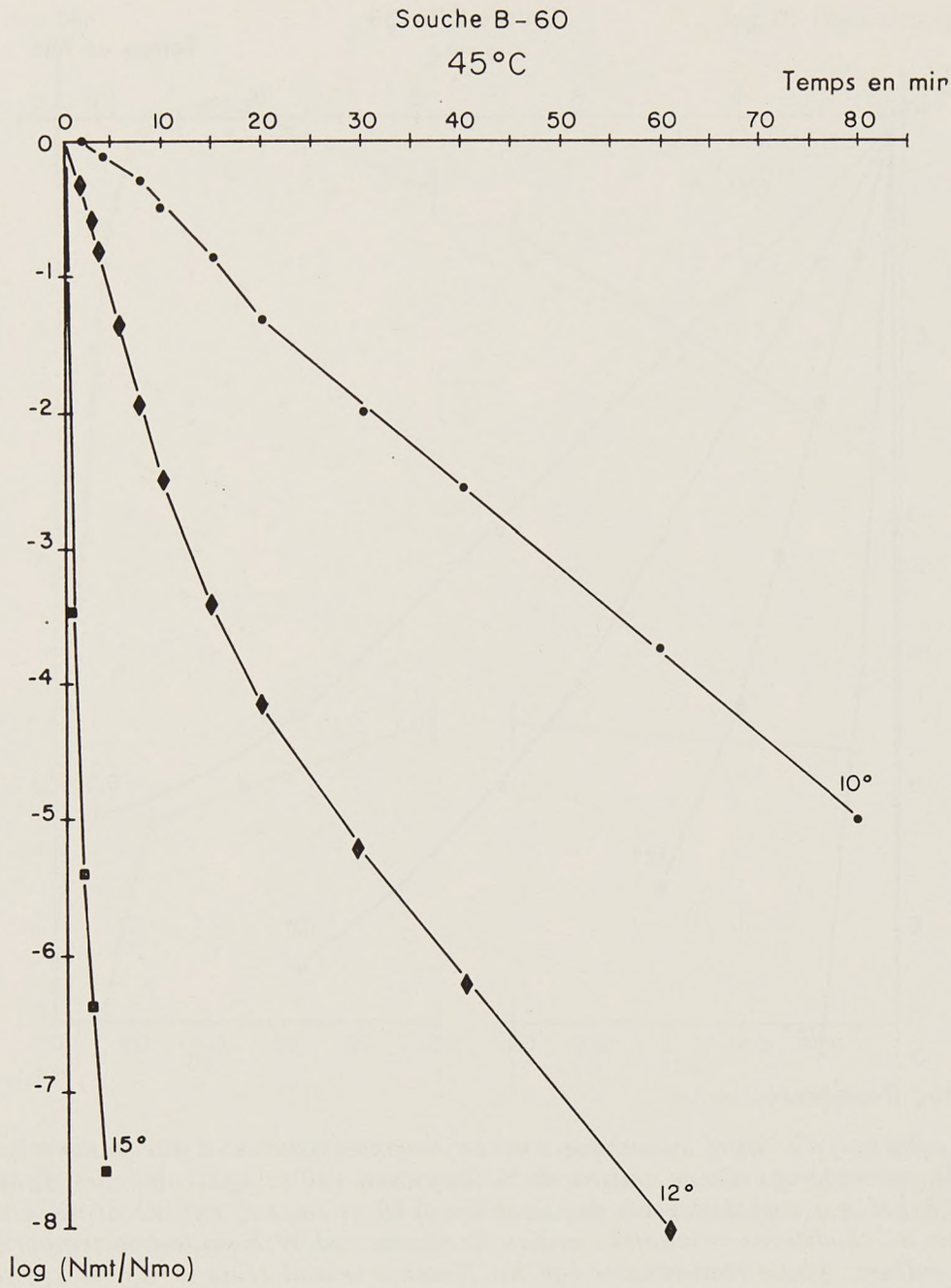


FIG. 13. — *Influence du degré alcoolique sur la thermorésistance d'une souche de bactérie lactique. Courbes de survie-temps d'une souche de* L. plantarum *(B 60) obtenues dans des tampons phosphate à pH 6 avec différents degrés d'alcool (10, 12, 15° alcool) à la température de 45 °C dans les conditions suivantes : milieu de récolte LDP liquide à la température de 28 °C. Age de la culture : phase stationnaire (96 h). Nombre initial Nmo = 0,8 — 1.10⁸/ml. Numération sur LDP gélosé après incubation à 28 °C.*

vin, la D40 passe de 50 min à 11° d'alcool à 33 min pour 12° d'alcool et 23,1 min pour 13° d'alcool.

Pour ces auteurs la valeur de Z ne varie pas suivant le degré alcoolique du milieu.

Influence du pH

La figure 15 indique en fonction du pH du milieu d'essai, les courbes des valeurs de D_T déterminées en utilisant la partie rectiligne des courbes correspondantes à la destruction de la fraction la plus importante. Les levures *P. polymorpha* présentent un optimum de résistance à la température aux environs de pH 5 et *L. plantarum* présente un optimum de thermorésistance au pH voisin de 6. Pour les

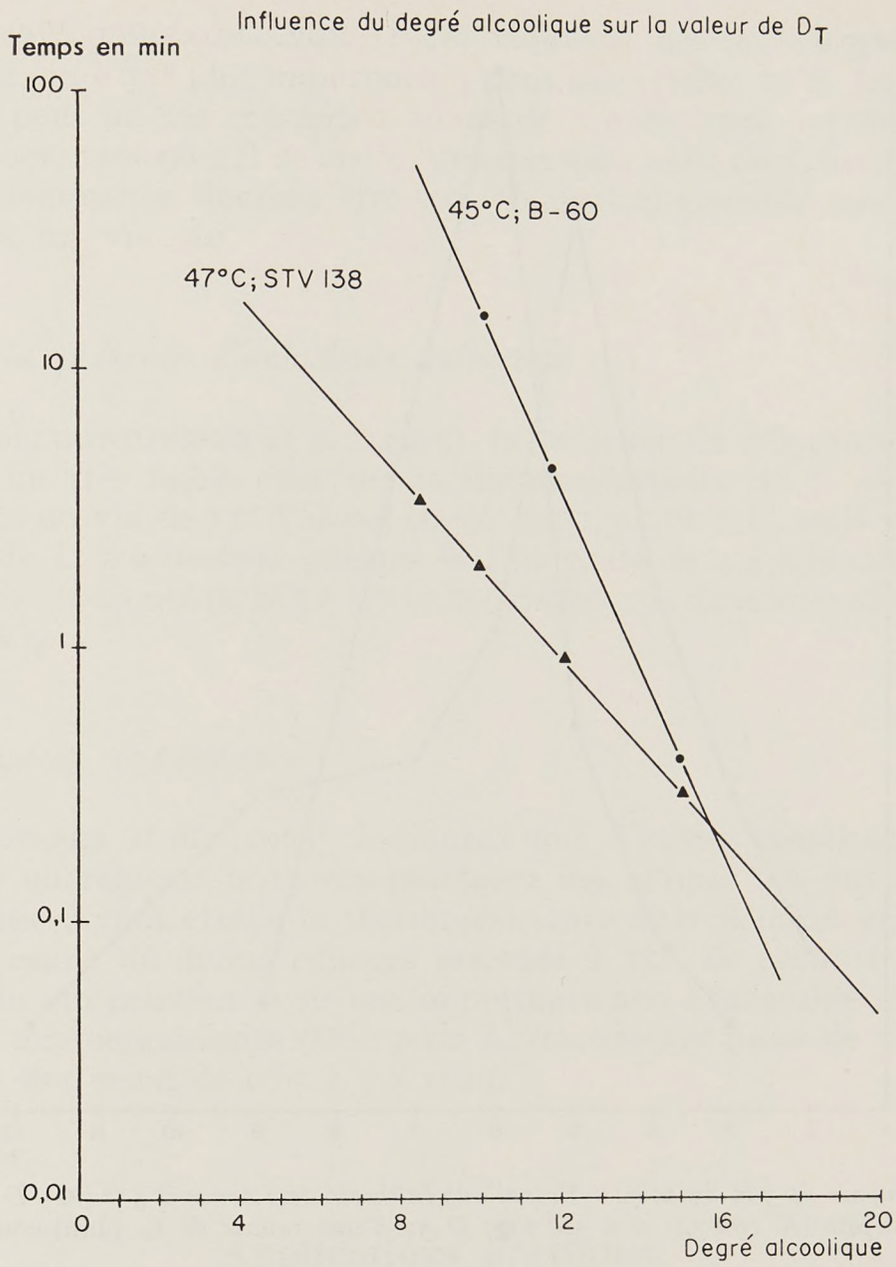


FIG. 14. — *Courbes de D_T en fonction alcool. Courbes des valeurs de D_T pour la souche de levure STV 138 et pour la souche de bactéries B 60 déduites des courbes de survie-temps présentées sur les figures 12 et 13.*

levures SPLITTSTOESSER *et al.* (1975) ont trouvé une D 49 variant de 0,75 min à pH 3,0 à 0,95 pour un pH 3,6 et 0,84 min pour un pH 4,0 dans un jus de raisin contenant 12 p. 100 d'alcool.

DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON (1977) trouvent une D 40 variant de 6,0 à pH 0,3 à 20,8 min pour un pH 3,8.

En ce qui concerne les bacilles, pour une souche *L. fructivorans* SPLITTSTOESSER *et al.* (1975) ont trouvé une D 60 variant de 0,68 pour pH 3,0 et 7,2 pour pH 4,0.

Pour des bactéries non sporulées, isolées de milieux non acide les résultats montrent un pH optimum de thermorésistance plus élevé entre 6 et 8 (WHITE, 1963) et même 10 pour une souche de *Lc. mesenteroïdes* isolée de jus de diffusion de betterave (MORFAUX et BIDAN, 1965).

La thermorésistance des germes diminue donc en fonction du pH à partir d'un pH optimal de résistance, 5 pour les levures, 6 pour les lactobacilles, aussi bien pour les bacilles lactiques que pour les levures et plus le pH est bas, plus sera facile la destruction thermique dans le vin.

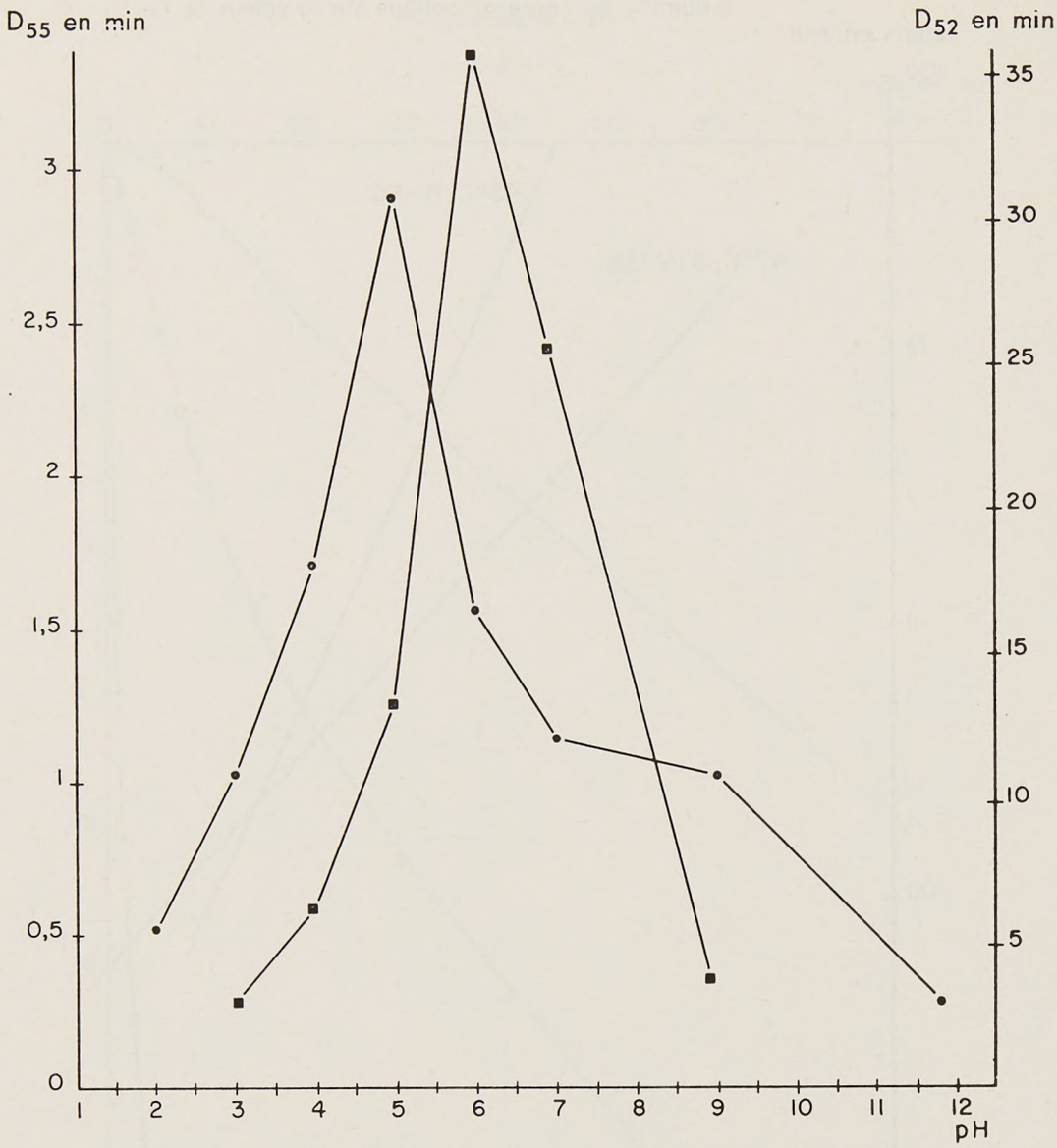


FIG. 15. — *Influence du pH du milieu d'essai sur la thermorésistance à 55° (●) D 55 d'une souche de* P. polymorpha *(X 100-54) et à 52° (■) D 52 d'une souche de* L. plantarum *(B 60-54).*

Influence de la concentration en sucre

Il a été montré par GIBSON (1973) pour deux souches de *Salmonella*, une souche de *Torulopsis globosa*, et une souche de *S. rouxii* en milieu contenant des concentrations croissantes de saccharose et de glucose que plus l'activité de l'eau est faible, plus la thermorésistance est forte. Par exemple, lorsque l'activité de l'eau passe de 0,995 à 0,85 (10 p. 100 à 60 p. 100 de sucre en poids) les valeurs de D60 passent pour *Salmonella* de 0,18 à 10 min et pour *S. rouxii* de moins de 0,1 min à 10 min. De plus, CORRY (1974) a montré que la thermorésistance à 65° de trois souches de *Salmonella* était augmentée lorsqu'elles étaient placées dans des solutions de sucre ou de polyols de concentrations croissantes : les valeurs de D65 diminuent pour une même concentration (poids/volume) lorsque l'on passe du saccharose au glucose, au sorbitol, au fructose, au glycérol (exemple à 70 p. 100 de polyol, la D65 passe de 53 à 42, 20, 12, 0,9 min).

SPLITTSTOESSER *et al.* (1975), montrent que l'addition à un vin de 12° de 10 p. 100 de glucose augmente la D60 *L. fructivorans* de 1,8 à 4,8, mais accroît faiblement la D45 pour *L. plantarum* (0,31-0,39) et la D49 pour une levure à voile (flor yeast) : (0,77-0,83).

DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON (1977) trouvent une action protectrice des sucres dans un vin à 12° plus importante : pour une souche de *S. bayanus*, la D42 passe de 2,74 pour un vin contenant moins de 2 g de sucre par litre à 7,20 min pour un vin contenant 96 g/l de sucre. Ces résultats indiquent donc que les paramètres de pasteurisation devront être sensiblement augmentés pour un vin doux par rapport à un vin sec.

Influence de la présence d'anhydride sulfureux

D'après SPLITTSTOESSER *et al.* (1975), la présence de SO_2 (jusqu'à 50 mg/l) semble avoir un très faible effet sur la thermorésistance de *S. cerevisiae* et *L. plantarum* dans un vin de 11° d'alcool (D49 : 1,2-1,3-0,81-1,1), mais réduit la thermorésistance de *L. fructivorans* puisque la D60 passe de 4,4 min dans le vin dans lequel il n'a pas été ajouté de SO_2 à 0,70 min dans les vins dans lesquels a été apporté 50 mg/l de SO_2.

Influence d'autres constituants

SPLITTSTOESSER *et al.* (1975), indiquent que d'autres constituants des vins peuvent jouer un rôle sur la thermorésistance des germes tels que les composés polyphénoliques. Ayant étudié la thermorésistance de trois microorganismes dans des vins provenant de divers cépages ramenés à 11°, ils pensent que d'autres constituants du vin peuvent avoir une importance non négligeable sur la thermorésistance des microorganismes (D60 pour *L. fructivorans* passe de 1,0 à 2,3 min, D49 pour une flor yeast de 0,87 à 2,2 min).

Applications pratiques

Ayant obtenu par l'expérimentation ou par des références bibliographiques un certain nombre de résultats sur la thermorésistance des levures et des bactéries lactiques en fonction d'un certain nombre de facteurs du milieu, nous avons essayé d'utiliser ces valeurs dans la pratique de la pasteurisation du vin. Nous avons d'abord choisi le modèle de courbe de survie qui nous paraissait le plus opérationnel et donc nous avons choisi les courbes exponentielles bien que certaines s'éloignent de ce modèle (sigmoïdes, traînées, épaulements...).

Les souches produisant des amas posent des problèmes mais ils sont en général plus thermosensibles que les autres, notamment les Leuconostoc.

Il nous a fallu alors choisir des valeurs de pasteurisation des organismes pour le calcul des unités de pasteurisation. Ces valeurs sont habituellement présentées pour 60° mais cela nous donnait des valeurs d'U P souvent inférieures à l'unité. Aussi avons-nous préféré prendre comme référence la température de 50°.

Par ailleurs, nous avons utilisé des courbes de TRT_5, pour calculer le tableau d'U P car les vins prêts à la pasteurisation sont généralement limpides et contiennent moins de 10^5 germes/ml. La courbe de TRT_2 prise pour comparer les valeurs de pasteurisation nous permet d'abaisser la population de 10^5 germes/ml à 1 germe/ml ou de 10^2 germes/ml à 1 germe/l.

Cela n'est pas toujours une sécurité suffisante, car cela dépend des circuits de distribution et de leur longueur. Il est cependant facile de passer du tableau utilisant la TRT_5 à un tableau utilisant une TRT_6 ou une TRT_{10}.

Ayant donc choisi le modèle exponentiel, et recherchant une destruction de 10^5 germes /ml à 1 germe /ml, nous avons tracé les courbes de TRT_5 des différentes expérimentations (fig. 16).

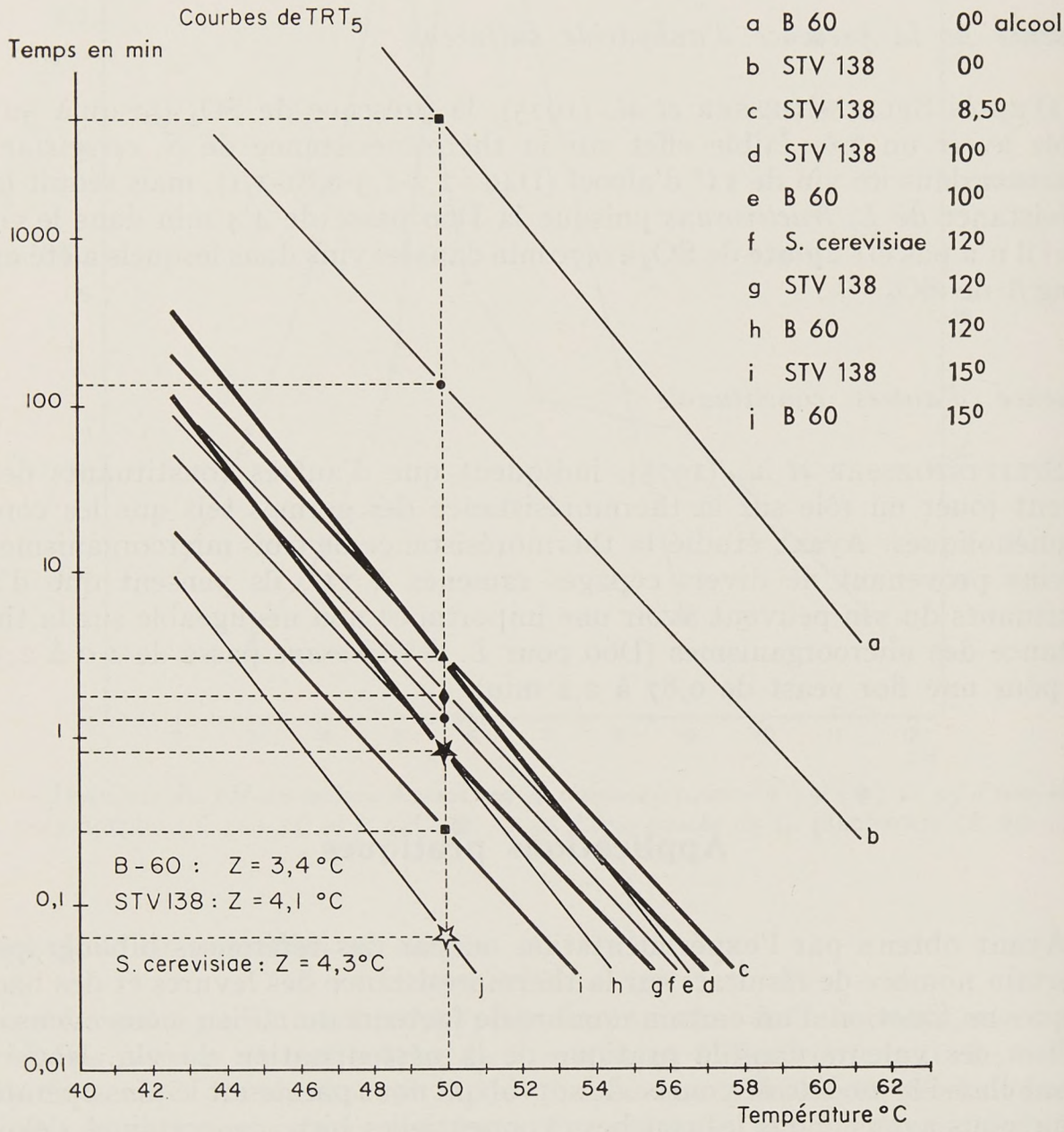


FIG. 16. — *Comparaison des différentes courbes de TRT_5 obtenues pour les souches* S. bayanus *STV 138*, L. plantarum *B 60, et* S. cerevisiae (DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON, 1977

Si nous excluons les courbes *a* et *b* (pasteurisation dans un milieu sans alcool), nous voyons que toutes les courbes sont inférieures à la courbe *c* (*S. bayanus* 8,5°) et *e* (*Lactobacillus* à 10° d'alcool).

Prenant alors pour valeur de Z, 3,4 et 4,5, il nous a été facile de calculer les correspondances en unité de pasteurisation aux différentes températures, ayant pris pour base une U P = 1 min à 50° (tabl. 3).

Disposant de ces tableaux, et connaissant les valeurs de P50, de différents travaux (tabl. 4), il est facile de calculer les U P nécessaires à une pasteurisation, suivant les températures utilisées.

TABLEAU 3

Unités de pasteurisation (1 mn à 50° : 1 U P) par min de traitement en fonction température pour les deux valeurs de Z retenues

T °C	U P Z=3,4 °C	U P Z=4,5 °C	T °C	U P Z=3,4 °C	U P Z=4,5 °C	T °C	U P Z=3,4° C	U P Z=4,5 °C
40,0	0,001	0,006	55,0	29,6	12,9	65,5	36210	2 754
45,0	0,034	0,08	55,5	41,5	16,7	66,0	50 802	3 594
45,5	0,047	0,10	56,0	58,2	21,5	66,5	71 276	4 642
46,0	0,067	0,13	56,5	87,3	27,8	67,0	100 000	5 995
46,5	0,093	0,17	57,0	114,5	35,9	67,5	140 400	7 743
47,0	0,13	0,22	57,5	160,7	46,4	68,0	196 842	10 000
47,5	0,18	0,28	58,0	225,4	59,9	68,5	276 170	12 915
48,0	0,26	0,36	58,5	316,2	77,4	69,0	387 468	16 681
48,5	0,36	0,46	59,0	443,7	100,0	69,5	543 618	21 544
49,0	0,51	0,60	59,5	622,5	129,2	70,0	762 699	27 826
49,5	0,71	0,77	60,0	873,3	166,8	71,0	1501 311	46 416
50,0	1,0	1,0	60,5	1 225	215,4	72,0	2 955 209	77 426
50,5	1,4	1,3	61,0	1 719	278,3	73,0	5817 091	129 155
51,0	2,0	1,7	61,5	2 412	359,4	74,0	11 450 475	215 443
51,5	2,8	2,2	62,0	3384	464,2	75,0	22 539 339	359 381
52,0	3,9	2,8	62,5	4 748	599,5	80,0	66 084 629	4 641 589
52,5	5,4	3,6	63,0	6 661	774,3			
53,0	7,6	4,6	63,5	9 345	1 000,0			
53,5	10,7	6,2	64,0	13 111	1 292			
54,0	15,0	7,7	64,5	18 395	1 668			
54,5	21,1	10,0	65,0	25 809	2 154			

TABLEAU 4

Valeurs P_{50} (temps en mn à 50° pour diminuer une population microbienne de 10^5 g/ml 1 g/ml) pour la souche S. bayanus *S T V 138, la souche* S. cerevisiae (DEVEZE et RIBÉREAU-GAYON, 1977) *et la souche* L. plantarum *B 60 déduites de la figure de TRT_5 (courbe 16). ( ) chiffres calculés*

	P^5_0 en min					Valeurs Z° C
Degré alcoolique.	0	8,5	10	12	15	
Souche :						
S. bayanus S T V 138 . .	133,7	3,2	1,9	0,8	0,3	4,1
S. cerevisiae.	(139)	(5,6)	(3,2)	1,5	(0,5)	4,3
L. plantarum B 60	497,4	(7,9)	2,6	2,8	0,07	3,4

Ainsi, il est possible de pasteuriser un vin avec 0,3 et 10 U P_{50} soit 0,3 min à 10 min à 50^0. Si nous nous exprimions en U P_{60}, il faudrait entre 0,003 et 0,06 U P_{60}. Une minute à 60^0 équivaut à 166 min à 50^0 pour un Z de $4,5^0$.

Ces chiffres peuvent être multipliés par 2 si on veut s'assurer une destruction thermique de 10^{10}, c'est-à-dire abaisser la population de 10^5 termes/l à 1 germe dans 100 l et donc d'avoir une chance sur 100 de trouver une bouteille qui contient encore un germe.

Les valeurs de pasteurisation utilisées dans la pratique sont en général beaucoup plus élevées : elles peuvent être de 1 U P_{60} soit 166 U P_{50} dans le cas de thermolisation bien conduite, elles sont de 20 U P_{60} = 3 320 U P_{50} dans le cas de pasteurisation en bouteille, et peuvent être de 500 U P_{60} = 83 000 U P_{50} dans le cas de flash pasteurisation.

Conclusion

A la suite d'une étude de thermorésistance des levures et des bactéries lactiques isolées du vin ou d'autres milieux, il nous a été possible d'obtenir les valeurs de Z pour différentes souches dans différentes conditions de milieux, puis de calculer un tableau d'UP applicables au milieu vin.

Par ailleurs, pour assurer une diminution de la population microbienne du vin de 10^5 germes/ml à 1 germe/ml, ou de 10^2 germes /ml à 1 germe /l, les valeurs d'UP_{60} varient de 0,3 à 10 et les U P_{60} de 0,003 à 0,06 suivant la concentration en alcool du vin.

Ces normes sont souvent largement dépassées dans la pratique.

L'alcool joue un rôle très important sur la thermorésistance des microorganismes, le sucre peut jouer un rôle protecteur, mais dans une proportion nettement moindre.

Il faut cependant noter que la teneur en oxygène du vin joue un rôle important lors de la pasteurisation du vin; les phénomènes d'oxydation chimique et biochimique peuvent être fortement accélérés lors de la montée de la température, et il est recommandé de pasteuriser des vins ne contenant que des traces d'oxygène.

Il faut également rappeler que la pasteurisation intervient également sur certaines protéines, notamment à haute température, en les précipitant, et d'autre part en dissolvant les petits cristaux de tartre utiles ou nuisibles, pour amorcer la précipitation du bitartrate de potassium.

Enfin la pasteurisation permet également de détruire les enzymes mais ce point est souvent plus important pour la pasteurisation des moûts que pour celle des vins.

La pasteurisation en bouteille utilise souvent une trop forte quantité d'UP, les phénomènes d'échange de chaleur jouant alors un rôle important. En employant des échangeurs de chaleur pour la pasteurisation, il est plus facile d'affecter le nombre exact d'UP mais il demande un plus grand soin et une grande technicité pour la mise en bouteille.

Des contrôles bactériologiques sont alors nécessaires à périodicité variable afin de contrôler le processus de pasteurisation et le circuit d'embouteillage avec des méthodes permettant de mesurer de faibles populations dans une prise d'échantillon.

La pasteurisation appliquée avec réflexion au vin, est une technique efficace pour assurer au vin une excellente stabilité et lui conserver ses propriétés originales pendant la durée de sa conservation.

Summary

Theoretical and practical difficulties of the wine biological stabilization with heat treatments

The use of heat as one of the physical procedures for stabilizing wine is not a recent innovation. The pasteurization of wine has been, for a long time, an empirical technique and those uzing it tend to use too wide a safety margin. The correct utilization of this technique involves the time-temperature combination being kept to a minimum.

Using a reactor the thermoresistance of non-sporulating micro-organisms has been studied. Curves showing the survival times of the different yeasts and lactic bacteria were constructed. Different types of curves were obtained. The thermoresistances of the yeasts and the lactic bacteria were quite similar but both varied with varying conditions of the media.

In effect, time and temperature are not the only factors which intervene in thermal degradation of micro-organisms. The higher the microbial content of a treated wine the higher will be the time-temperature pasteurization factor required. It is therefore essential to first treat a wine to lower the microbial content. The age of the culture is another important factor since microorganisms in an exponential phase of growth are less resistant than those in a stationary phase. At a given temperature the degradation time for a determined microbial population varies exponentially with alcoholic degree, for yeasts as well as lactobacillus. Sugar, on the other hand, exerts a protecting effect for the micro-organisms and the pasteurization parameters are consequently higher. Other factors such as the pH and the sulphur dioxide concentration also have an influence.

Data both experimentally obtained and that found in the bibliography have been used to construct a table of Pasteurization Units (U.P.) applicable to wines. The number of Pasteurization Units (between 0.2 and 10) required to assure an effective stabilization for different wines are given.

The control of pasteurization is important and involves the problem of numerating very low populations.

Key-words: *Wines — Biological stabilization — Heat treatments — Non sporulated microorganisms — Survivalcurves — Pasteurisation parameters.*

Références bibliographiques

ANAND J. C., LEISRAM M. S., 1962. Heat resistance and destruction rates of *Saccharomyces cerevisiae* in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) juice, *J. Sc. Ind. Res.*, **21** C, 287-289.

AREF H., CRUESS W. V., 1931. An investigation of the thermal death point of *Saccharomyces ellipsoïdeus*, *J. Bact.*, **27** (5), 443-452.

BAILLOT D'ESTIVAUX L., 1958. La conservation des vins blancs en bouteilles sans anhydride sulfureux, *C. R. Acad. Agric.*, **44**, 342-345.

BIGELOW W. D., ESTY J. R., 1920. Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms, *J. Infectious Diseases*, **27**, 602-617.

BIGELOW W. D., 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves, *J. Infectious Diseases*, **29**, 528-536.

BROWN M. R. W., MELLING J., 1971. Inhibition and destruction of micro-organisms by heat. Ch. 1 in *Inhibition and Destruction of the Microbiol, Cell.* Ed. W. B. HUGO, *Academic Press*, London.

CORRY J. E. L., 1974. The effect of sugars and polyol on the heat resistance of *Salmonellae*, *J. Appl. Bact.*, **37**, 31-43.

DEL VECCHIO H. W., DAYHARSH C. A., BASELT F. C., 1951. Thermal death time studies on beer spoilage organisms, *A.S.B.C. Proceedings*, 45-50.

DEVEZE M., RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Thermorésistance des levures dans le vin, application à la stabilisation biologique des vins par la chaleur, *Conn. Vigne et Vin*, **11** (2), 131-163.

DOUTSIAS G., 1974. *Étude de la thermorésistance d'une souche de* Pichia etchellsii *isolée de saumure d'olives vertes.* D.E.S. Université de Dijon 17-12-1974.

DOUTSIAS G., 1977. *Étude de la thermorésistance de souches de levures et de bactéries lactiques isolées de saumures d'olives vertes.* Thèse Ingénieur-Docteur, Université de Dijon 13-06-1977, 136 p.

ELLIKER P. R., FRAZIER W. C., 1938.Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of *Escherichia coli, J. Bact.*, **36**, 83-98.

FERNANDEZ DIEZ M. J., GONZALEZ CANCHO F., 1967. Resistancia termica del *Lactobacillus plantarum, Rev. de Cienc. Apda*, **115**, 117-120.

GIBSON B., 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative microorganisms, *J. Appl. Bact.*, **36**, 365-376.

GONZALEZ-PELLISO F., GONZALEZ CANCHO F., REJANO NAVARO L., 1975. Resistencia termica de *Lactobacillus plantarum* y " difteroides " aislados de salmueras de aceitunas verdes estilo espanol, *II-Seminaire Oleicole International*, Cordoba, Octobre 1975.

JACOB F. C., ARCHER T. E.,, CASTOR J. G. B., 1964. Thermal death time of yeast. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **15** (2), 69-74.

MORFAUX J. N., BIDAN P., 1965. Étude de la résistance thermique d'une souche de *Leuconostoc mesenteroïdes* isolée de jus de diffusion de sucrerie de betteraves. *Indust. Alim. Agric.*, **82**, 11, 1145-1154.

MORFAUX J. N., 1973. Théorie de la destruction thermique des germes. Colloque Int. d'Oen. d'Arc et Senans, *N° spécial Vignes et Vins*, 119-124.

MURDOCK D. I., TROY V. S., FOLINAZZO J. F., 1953. Thermal resistance of lactic acid bactéria and yeast in orange juice and concentrate, *Food Research*, **18** (1), 85-89.

PUT H. M. C., DE JONG J., SAND F. E. M. J., VAN GRINSVEN A. M., 1976. Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks, *J. Appl. Bact.*, **40**, 135-152.

SCHMIDT C. F., 1957. Thermal resistance of microorganisms in Antiseptics Disinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization. Ed. by REDDISH C. F., 831-884. Lea end Febiger.

SPLITTSTOESSER D. F., LAURA LEE LIENK, MARTHA WILKISON, STAMER J. R., 1975. Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage organisms., *Appl. Microbiol.*, **30**, 3, 369-373.

STEVENSON K. E., RICHARDS L. J., 1976. Thermal injury and recovery of *Saccharomyces cerevisiae, J. Food. Science*, **41**, 136-137.

STUMBO C. R., 1973. *Thermobacteriology in food processing, 2nd. Ed. Academic Press*, Inc, New-York and London, 325 p.

VAN UDEN N., ABRANCHES P., CABECA-SILVA C., 1968. Temperature functions of thermal death in yeast and their relation to the maximum temperature for growth, *Archiv. für Mikrobiologie*, **61**, 381-393.

WHITE H. R., 1953. The heat resistance of *Streptococcus faecalis, J. Milk and Food Technol.*, **19**, 209-212.

WHITE H. R. The effect of variation in pH on the heat resistance of cultures of *Streptoccocus faecalis, J. Appl. Bact.*, **26**, 91-99.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 315-317

INTERVENTION

Quelques problèmes de la stabilisation biologique des vins doux par la chaleur

M. DEVÈZE

Institut d'Œnologie,
Université de Bordeaux II (France)

Introduction

Après avoir étudié la théorie de la thermorésistance des levures dans le vin en fonction de sa composition, nous avons recherché les conditions pratiques de pasteurisation. Nos résultats confirment et complètent ceux donnés par BIDAN et ses collaborateurs.

Mise en évidence de l'existence dans les moûts en fin de fermentation d'espèces de levures particulièrement thermorésistantes

La souche la plus résistante que nous ayons testé au laboratoire est une souche de *Saccharomyces cerevisiae ;* elle possède un temps de réduction décimale d'environ 8 minutes à 44 °C dans un vin sec de 12 °GL et de pH 3,5.

Le calcul indique qu'un chauffage fournissant 0,016 unités de pasteurisation (UP) est à priori suffisant pour réduire la population de levures d'un vin de 10^7 à moins de 1 levure par ml. SPLITTSTOESSER *et al.*, également pour une souche de *Saccharomyces cerevisiae,* donnent un temps de réduction décimale de 1,6 minute à 49 °C; pour obtenir la même réduction il faudrait dans ce cas un chauffage équivalent à 0,04 UP.

Ces chiffres laissaient prévoir qu'un chauffage fournissant 0,05 UP serait suffisant pour stériliser un vin au moment du mutage. Pour contrôler ce résultat théorique nous avons pasteurisé différents vins en fin de fermentation en faisant

varier les paramètres du chauffage et en contrôlant le nombre de levures vivantes à l'entrée et à la sortie de l'appareil. Les chiffres obtenus (tabl. 1) montrent tout d'abord que les chauffages prévisibles ne sont pas suffisants pour stériliser les vins, et que l'on doit pour cela fournir environ 0,5 UP. La prise en compte de la disper-

TABLEAU 1

Pasteurisation de différents vins dans les conditions de la pratique

Lev. viv. /ml av. traitement	T °C maxi.	Lev. viv. /ml ap. traitement	UP
Vin n° 1 :			
Composition : d°GL 11,55; pH 3,45; sucres — de 2 g/l			
$2,1.10^7$	60	1	$4,0.10^{-1}$
	55	7	$3,2.10^{-2}$
	50	$2,1.10^6$	$2,5.10^{-3}$
	45	$1,6.10^7$	$2,0.10^{-4}$
	40	$1,9.10^7$	$1,6.10^{-5}$
Vin n° 2 :			
Composition : d°GL 12,1; pH 3,42; sucres — de 2 g/l			
$3,0.10^7$	60	1	$4,5.10^{-1}$
	57	$1,5.10^1$	$9,8.10^{-2}$
	54	$4,2.10^2$	$2,1.10^{-2}$
	51	$3,8.10^5$	$4,6.10^{-3}$
Vin n° 3 :			
Composition : d°GL 11,8; pH 3,75; sucres 94 g/l			
$1,7.10^7$	61	1	$6,1.10^{-1}$
	57	$8,9.10^2$	$8,0.10^{-2}$
	53,5	$1,7.10^4$	$1,3.10^{-2}$
	51	$1,6.10^6$	$3,8.10^{-3}$

TABLEAU 2

Genre et espèce des souches isolées avant et après chauffage

Origine du prélèvement	Genre et espèce des souches isolées
Vin n° 1 av. chauffage	5 Saccharomyces cerevisiae
Vin n° 1 ap. chauf. 50 °C . .	8 Saccharomyces cerevisiae
Vin n° 1 ap. chauf. 55 °C . .	2 Saccharomyces bailii 1 Schizosaccharomyces pombe
Vin n° 2 ap. chauf. 57 °C . . .	4 Saccharomyces bailii 10 Schizosacharomyces japonicus

sion des temps de séjour dans le pasteurisateur, ce qui diminue l'efficacité du traitement, ne semble pas suffisante pour expliquer ces différences.

De plus si l'on représente la variation du logarithme du nombre de survivants en fonction du nombre d'unités de pasteurisation fourni on doit, en théorie, obtenir une droite dans le cas d'une population de résistance thermique homogène. Or les courbes obtenues avec les résultats du tableau 1 sont caractéristiques d'une population de résistance thermique hétérogène.

A partir des différents prélèvements effectués lors des traitements précédents, nous avons isolé et identifié différentes souches de levures (tabl. 2). Les résultats mettent en évidence la plus grande thermorésistance de *Saccharomyces bailii* et de certaines *Schizosaccharomyces* par rapport à *Saccharomyces cerevisiae*. On doit signaler que :

— la thermorésistance de *Schizosaccharomyces japonicus* est renforcée par le fait que, contrairement à la plupart des levures, elle forme très rapidement des spores en milieu liquide.

— *Saccharomyces bailii* apparaît globalement plus résistante que *Saccharomyces cerevisiae* bien que la souche testée au laboratoire ait été trouvée plus sensible.

Ces résultats montrent l'importance de certaines espèces de levures malgré leur présence en très faibles proportions (de l'ordre de 1 pour 10 000); elles imposent à elles seules des chauffages plus importants que ceux nécessaires pour détruire la totalité des autres souches. La plus ou moins grande proportion de ces souches permet de comprendre par exemple que le vin n° 2, bien que de degré alcoolique supérieur à celui du vin n° 1, nécessite un chauffage plus important.

Influence du sulfitage sur la thermorésistance

Splittstoesser *et al.* n'ont pas constaté d'influence nette de doses d'anhydride sulfureux de 25 et 50 mg/l sur la thermorésistance d'une souche du genre *Saccharomyces*. Nous avons étudié l'influence de doses supérieures. Les temps de réduction décimale à 45 °C, pour une souche de *Saccharomyces bayanus*, sont :

— 4,2 minutes dans un vin sec de 12 °GL et de pH 3,5.

— 3,4 minutes dans le même vin sulfité à 150 mg/l quelques jours avant le traitement; la teneur en anhydride sulfureux libre au moment du traitement était de 15 mg/l.

— 2,2 minutes pour le même vin sulfité à 150 mg/l juste avant le traitement.

Ces résultats montrent l'intérêt d'un sulfitage juste avant un traitement de pasteurisation destiné à muter un vin doux pour renforcer l'efficacité de la chaleur tout en permettant une bonne homogénéisation du SO_2.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 319-331

Possibilités d'application de procédés utilisant des membranes pour la stabilisation des vins (Ultrafiltration, Osmose inverse, Électrodialyse)

K. WUCHERPFENNIG

Hess Forschungsanstalt für Wein, Obst-und Gartenbau Geisenheim/Rh (Bundesrepublik Deutschland)

Résumé

Par des procédés utilisant des membranes on peut appauvrir ou enrichir en substances dissoutes une solution. En principe il existe deux procédés différents : la filtration sous pression à travers une membrane et l'électrodialyse.

On peut utiliser avec profit des procédés utilisant des membranes pour la préparation des jus de fruits et la vinification. Par exemple, on peut concentrer le moût de raisin par osmose inverse. Les moûts enrichis de cette manière sont à la base des vins de qualité supérieure. La fermentation achevée on peut éclaircir la couleur des vins par ultrafiltration ce procédé permettant l'élimination des polyphénols oxydés et condensés. On peut également éliminer de grosses molécules protéiques de cette manière ce qui rend inutile un traitement par la bentonite.

Une stabilisation de bitartrate de potasse du moût et du vin peut être obtenue et par osmose inverse et par électrodialyse. Puisqu'au cours de l'osmose inverse l'alcool éthylique passe à travers la membrane dans la même mesure que l'eau, on peut utiliser ce procédé également pour la désalcoolisation partielle de la bière et du vin. Pouvant remplacer une espèce d'ion par une autre à l'aide de l'électrodialyse, on est en mesure d'éliminer une partie de l'acide sulfureux du vin avec les substances auxquelles il se combine.

Mots clés : *Moûts — Vins — Stabilisation — Membranes — Osmose inverse — Ultrafiltration — Électrodialyse.*

Introduction

On entend par procédés utilisant des membranes les moyens permettant de séparer des substances en solutions à l'aide de membranes. Il faut distinguer deux procédés fondamentalement différents, soit :

— la filtration sous pression à travers des membranes;

— l'électrodialyse.

Dans le premier cas, la force motrice est une différence de pression, qui maintient un flux à travers une membrane; dans le second cas, la force motrice est une différence de potentiel électrique sous l'influence de laquelle les ions passent d'une solution à une autre à travers une membrane.

Ainsi, suivant le produit désiré, il est possible soit d'enrichir une solution en une substance, soit de l'appauvrir.

Filtration sous pression à travers des membranes

Le principe consiste en une filtration sous pression à travers une membrane semi-perméable. Il faut veiller à ce que cette membrane filtrante reste toujours active. Ceci ne peut être obtenu qu'en maintenant un courant turbulent au-dessus de la membrane soit en brassant le liquide, soit en l'aspirant rapidement (fig. 1).

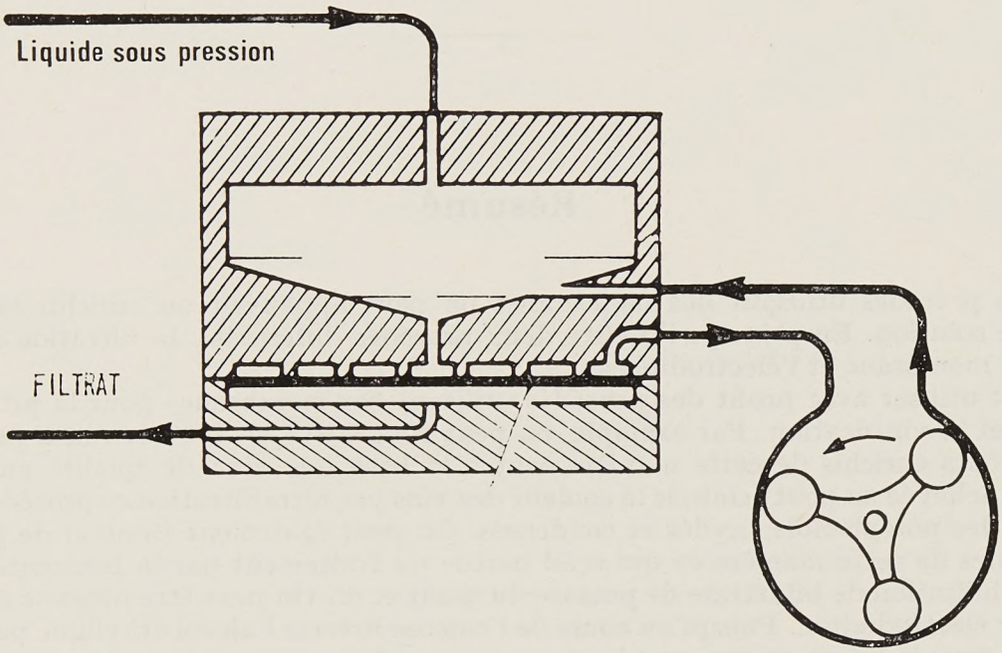


FIG. 1. — *Montage schématique d'un dispositif de filtration par membrane, muni d'une pompe.*

Ultrafiltration et hyperfiltration (osmose inverse)

Suivant la taille des particules des substances dissoutes à séparer, il faut distinguer ultrafiltration et osmose inverse.

Alors qu'avec l'ultrafiltration on effectue normalement la filtration de substances en solution colloïdale, il est possible par l'osmose inverse de séparer des substances en solution vraie (fig. 2).

On distingue les différentes membranes (LOEB et SOURIRAJAN, 1960; MANJIKIAN, 1967; LONSDALE, 1972) existant sur le marché par leurs possibilités de séparation; elles sont caractérisées par leur pouvoir de rétention :

— de particules d'un poids moléculaire précis dans le cas des installations d'ultrafiltration;

— de chlorure de sodium ou de saccharose dans le cas des installations d'hyperfiltration (SOURIRAJAN, 1964; WORLEY, 1970; LACEY, 1972).

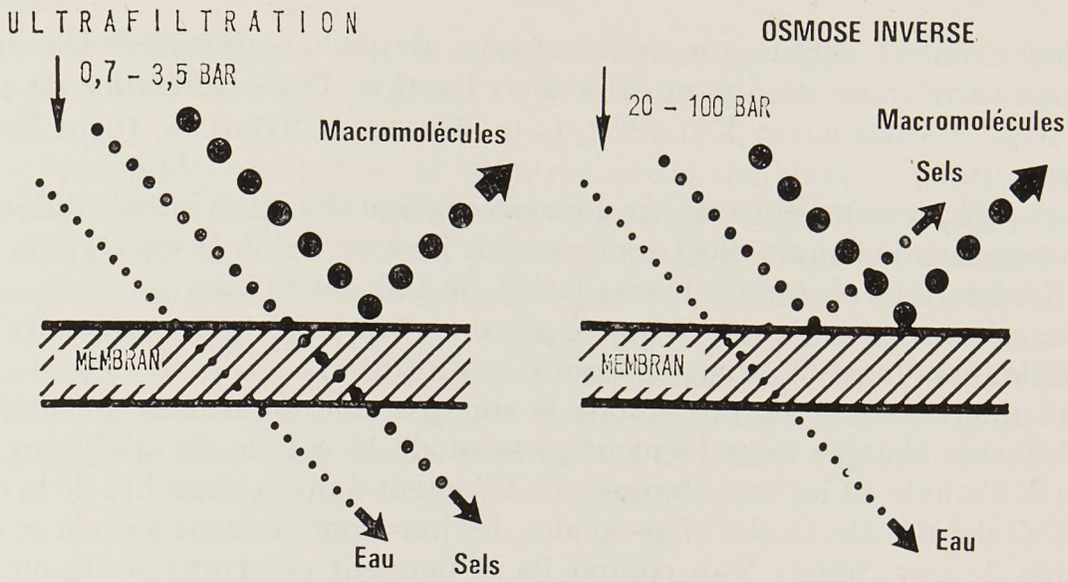


FIG. 2. — *Représentation schématique des procédés de séparation par ultrafiltration et par osmose inverse.*

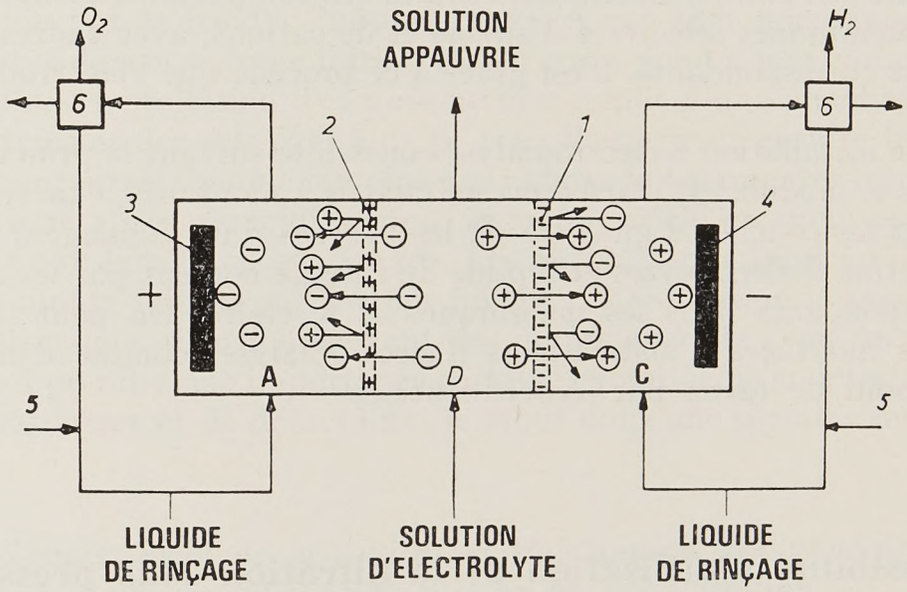


FIG. 3. — *Cellule triple d'une installation d'électrodialyse : les électrodes sont montées de façon à ce que se produise un appauvrissement en électrolytes dans la cellule du dialyseur.*

A : Anode.
D : Cellule du dialyseur.
C : Cathode.
1 : Membrane sélective des cations.
2 : Membrane sélective des anions.
3 : Anode.
4 : Cathode.
5 : Liquide de rinçage pour les cellules anodiques et cathodiques.
6 : Séparateur des gaz pour O_2 et H_2.

Électrodialyse

L'électrodialyse est un procédé au cours duquel des électrolytes passent à travers une membrane semi-perméable sous l'action d'une différence de potentiel (PAULI, 1942; MANEGOLD et KALAUCH, 1939; MEYER et STRAUSS, 1940; HELFRICH, 1962) (fig. 3).

Si on applique aux électrodes un courant continu, les ions chargés différemment se déplacent dans le champ électrique en sens inverse, selon le cas vers la cathode ou vers l'anode. Si l'on monte l'installation de telle sorte que :

— la cellule de l'anode soit séparée par une membrane perméable aux cations, de la cellule dans laquelle arrive le liquide à traiter;

— et que la cellule de la cathode le soit par une membrane perméable aux anions, les ions chargés négativement passent de la cellule du dialyseur dans la chambre de l'anode, et les ions chargés positivement dans la chambre de la cathode; dans les cellules des électrodes elles-mêmes, les ions commencent alors à se déplacer en fonction de leur charge. Mais comme ils ne peuvent pas traverser la membrane, étant donné qu'elle est chargée de la même façon que les ions, ils demeurent dans les cellules des électrodes. Ainsi en fin de compte, il se produit un appauvrissement en ions du liquide dans la cellule de dialyse, tandis que le liquide de rinçage dans les cellules des électrodes se trouve enrichi en électrolytes.

Les travaux de MEYER et STRAUSS (1940) constituèrent un pas dans le développement des installations d'électrodialyse. Ils utilisèrent des cellules multiples avec seulement une paire d'électrodes, cellules qui comportaient toujours alternativement des membranes sélectives d'anions et de cations, avec cadres intercalaires et séparateurs correspondants. C'est grâce à ce procédé que l'électrodialyse devint rentable.

Dans une installation d'électrodialyse construite suivant le principe de l'appareil à plaques le module est placé dans un châssis à montants, exactement comme les plaques et les couches d'un filtre ou les plaques d'un échangeur de chaleur à plaques. Solution d'électrolytes et liquide de rinçage coulent par les canaux et les sillons correspondants dans les membranes et le cadre. On peut aussi imaginer bien d'autres montages d'installations d'électrodialyse, comme dans la concentration du moût de raisin par hyperfiltration.

Possibilité d'utilisation de la filtration sous pression à travers des membranes pour l'élaboration des boissons

Il y a peu d'années encore, il n'existait pour la production de jus de fruit concentré que deux procédés, à savoir l'évaporation du liquide du fruit et la concentration par le froid. Mais seule l'évaporation a une importance pratique. Après que l'intérêt du procédé de l'osmose inverse, suscité en partie par l'énorme développement dans le domaine du traitement des eaux, s'étendit à l'industrie alimentaire, il était tout naturel de l'employer aussi pour la concentration du moût de raisin. De nombreux auteurs ont déjà relaté leurs expériences dans ce domaine (PEYNAUD et ALLARD, 1970). Lors d'essais personnels nous avons concentré du jus de raisin et constaté alors le passage de substances dissoutes à travers la membrane. Le perméat contenait 5,6 g /l d'extrait, soit une perte d'extrait de 1,1 p. 100; 0,7 p.

100 de sucres, ce qui montre que 2,9 g passèrent à travers la membrane, 9 p. 100 d'acides plus précisément acides tartrique et malique en quantités à peu près équivalentes.

D'après les bilans des acidités totales tartrique et malique, ainsi que des cendres du potassium et du calcium, on peut conclure à un déficit en tartre et en tartrate de calcium.

Dans l'ensemble, ces essais, et d'autres essais semblables réalisés plus tard, lors de concentration du jus de raisin par osmose inverse, montrent qu'il est possible de filtrer une partie de l'eau de fruit par ce procédé. Suivant la membrane choisie, on peut séparer du jus 20 l d'eau à l'heure par m^2 de surface de membrane. Cette quantité diminue cependant, avec l'augmentation du degré de concentration et atteint la moitié de cette valeur à une concentration d'environ 100° Oechsle, soit 23,8° Brix. Si on concentre davantage, le débit, à la même pression de travail, tend vers zéro; il existe donc des limites pratiques à ce procédé de concentration.

Enrichissement de moûts par hyperfiltration pour la production de vins d'un degré de qualité supérieur

Il est donc facile de produire des vins à partir de moûts concentrés par osmose inverse; ce procédé offre en outre la possibilité non seulement de concentrer les moûts, mais de les désacidifier en même temps dans une certaine mesure, ce qui est impossible avec le procédé classique de séparation de l'eau des fruits (évaporation et concentration par le froid) (Troost, 1955). A cet effet nous avons concentré un moût aux 2/3 de son volume initial, ce qui correspond à une variation de 34 p. 100, à l'aide d'une installation d'osmose inverse munie d'une membrane ayant un pouvoir de rétention des sels égal à 95 p. 100. Nous avons ensuite fait fermenter le moût ainsi concentré. Comme témoins nous avons fait fermenter le moût de base, le moût concentré après désacidification, le moût enrichi en sucre après désacidification et le moût enrichi en eau sucrée. Les résultats montrent qu'il est possible d'enrichir des moûts faibles par osmose inverse. Étant donné la prochaine interdiction, en Allemagne, d'enrichissement des moûts avec de l'eau sucrée, l'osmose inverse pourrait prendre une importance certaine en vinification, puisqu'elle permet à la fois de concentrer et de désacidifier le moût dans une certaine mesure.

Éclaircissement de la couleur et stabilisation des protéines dans le moût de raisin et le vin par ultrafiltration

Puisqu'il est possible de séparer des substances macro-moléculaires dans les boissons, il devait être possible d'obtenir par cette méthode un éclaircissement de la couleur et d'entreprendre une « stabilisation protéique ». Pour vérifier ces hypothèses, nous avons effectué une série d'essais, au cours desquels nous devions constater une diminution de l'intensité colorante et de la stabilité des protéines.

Au cours des essais, des boissons fortement colorées et atteintes de casse brune furent filtrées par des membranes d'une limite d'exclusion de 10 000 et de 50 000, c'est-à-dire que les molécules de poids moléculaires respectifs de 10 000 et de 50 000 ne pouvaient pas traverser la membrane. Nous avons alors observé que des jus fortement colorés et atteints de casse brune étaient nettement éclaircis après la filtration par la membrane d'une limite d'exclusion de 10 000, c'est-à-dire que la

casse brune avait diminué de façon importante, alors que n'apparaissait aucune différence avec le jus initial après filtration par des membranes d'une limite d'exclusion de 50 000.

Nous avons ensuite filtré une boisson stable en ce qui concerne les protéines par des membranes ayant des limites d'exclusion de 10 000 et de 30 000. Les filtrats furent mélangés à une solution saturée de sulfate d'ammonium et tenus pendant la nuit à 60° dans l'étuve; on détermina ensuite l'intensité du trouble apparu. Ces résultats récapitulatifs montrent qu'il est possible d'extraire des boissons les polyphénols macromoléculaires condensés à l'aide de l'ultrafiltration. Ils montrent ensuite que l'on peut préserver des boissons contre ces troubles protéiques par l'ultrafiltration, au cours de laquelle il faut utiliser des membranes qui retiennent les substances protéiques d'un poids moléculaire supérieur à 10 000.

Stabilisation du tartre par l'hyperfiltration

Comme on le sait, le tartre existe dans le vin et le jus de raisin en solution sursaturée. Il précipite en partie au cours du stockage, si bien qu'il faut stabiliser les moûts et les vins contre la précipitation du tartre, puisque les consommateurs souhaitent acquérir des produits clairs et brillants sans dépôts cristallins (RENSCHLER et HAUSE, 1953; WUCHERPFENNIG et RATZKA, 1967; WEGER, 1957, DICKINSON et STONEMAN, 1958; UNGER, 1964).

On peut obtenir artificiellement une précipitation du tartre par hyperfiltration en concentrant, par séparation de l'alcool et de l'eau. Il en résulte aussi un enrichissement en potassium et en tartre, ce qui fait précipiter rapidement le tartre qui se trouve alors en solution de plus en plus sursaturée; les conditions de la cristallisation devenant plus favorables (NEUBERG, 1971) pour l'augmentation de la concentration.

Si l'on veut provoquer une stabilisation tartrique à l'aide de l'hyperfiltration, il faut tout d'abord savoir jusqu'à quel degré il faut concentrer un vin pour que se produise un précipité tartrique rapide, c'est-à-dire qu'il faut connaître la conversion; par conversion on entend la quantité centésimale du perméat obtenu à partir du liquide de base. Si l'on connaît ces facteurs, il faut déterminer ensuite si la cristallisation du tartre dans le concentrat a lieu instantanément ou bien si elle nécessite un certain temps pour que le tartre puisse précipiter totalement. Pour éclairer cette question nous avons procédé à une série d'essais au cours desquels il fallait déterminer en premier lieu le débit et la possibilité de concentration du vin. Nous avons alors concentré trois vins : un blanc, un rosé et un rouge par osmose inverse à 80, 60, et 40 p. 100 de leur volume.

Les concentrats obtenus alors furent débarrassés par filtration du précipité formé immédiatement après le processus, et à intervalles de temps de plus en plus grands; on calcule leurs teneurs en tartre, en potassium et en calcium. Il s'avèra alors que dans le meilleur des cas, seul le tartre avait précipité. Les teneurs en calcium restèrent constantes.

Les résultats montrent que pour une conversion de 20 p. 100 il ne se produit dans les trois cas pratiquement aucun précipité de tartre. Pour une conversion de 40 p. 100 du vin rouge il ne se produit pratiquement aucune cristallisation de tartre non plus. Mais pour les vins blanc et rosé on voit apparaître une nette baisse de la teneur en acide tartrique par précipitation de tartre.

Pour une conversion de 60 p. 100 on observe déjà dans les trois vins une nette baisse de la teneur en acide tartrique; elle se poursuit nettement au cours des heures

suivantes, c'est-à-dire que le tartre continue à précipiter. Dans le seul cas du vin rosé, l'allure de la courbe indique qu'un équilibre stable est atteint.

Les prélèvements de concentrat effectués à des intervalles de temps précis furent alors mélangés en proportions correspondantes au perméat qui en avait été séparé, et on examina leur stabilité en tartre. Puis on ajouta 1 vol. p. 100 d'alcool aux prélèvements; pendant 6 jours on garda le mélange à — 5 °C. Ensuite on examina visuellement la précipitation du tartre.

Les résultats montrent qu'à 40 p. 100 de conversion aucun vin n'a atteint de stabilité tartrique. A une conversion de 40 p. 100 seul le vin blanc est devenu stable après 48 heures de stockage du concentrat. A une conversion de 60 p. 100 le tartre avait tellement précipité dans le vin blanc que ce dernier était stable peu de temps après la filtration des cristaux. Pour le rosé, on ne put obtenir aucune stabilisation du tartre, malgré une conversion de 60 p. 100, et après un stockage de 48 heures.

Le vin rouge ne peut être stabilisé qu'avec une conversion de 60 p. 100 et un stockage de 48 heures.

Stabilisation du tartre par électrodialyse

Stabilisation du jus de raisin

La fabrication du concentrat de jus de raisin se heurte dans bien des cas à des difficultés techniques, car lors de l'évaporation le tartre peut précipiter en grande quantité. Il a normalement la facheuse particularité de se fixer solidement sur les parois de l'évaporateur et on ne peut que difficilement l'en séparer en lavant l'évaporateur. C'est pour cela que subsiste l'obligation d'abaisser la teneur en potassium et en tartre afin qu'aucune précipitation de tartre ne se produise plus. C'est là que le procédé de l'électrodialyse apparaît particulièrement indiqué.

Lors d'essais personnels, nous avons utilisé une installation pilote avec laquelle 200 litres de jus de raisin par heure pouvaient être soumis à l'électrodialyse dans une cellule multiple. Pour une charge totale de 4 000 litres la teneur en potassium fut abaissée à environ 700 mg /l. La totalité des essais montrent qu'à l'aide de l'électrodialyse on réussit à stabiliser le jus de raisin contre la précipitation tartrique, de sorte qu'il ne se produit aucune cristallisation au cours de la concentration.

Stabilisation du vin

Nous avons alors traité de même façon, des vins par électrodialyse et leur avons retiré une petite quantité d'ions potassium et d'anions. Les vins furent examinés avant et après traitement, ce qui donna le résultat suivant : la densité, la teneur en alcool et en sucre, aussi bien que la quantité d'acidité volatile des vins ne changent pratiquement pas; de toutes façons les valeurs établies se situent à l'intérieur de la marge d'erreur des méthodes d'analyses.

Diminuent de façon minime les substances suivantes : l'extrait total et l'extrait sans sucre, l'acidité totale, l'acide malique, l'acide lactique, le sodium, le calcium et l'acide phosphorique. Diminuent de façon importante l'acide tartrique, le potassium, les cendres et leur alcalinité, l'anhydride sulfureux et le sulfate de potassium.

Les valeurs présentant des variations relativement faibles sont réunies dans le tableau 1. Les moyennes furent calculées en même temps, car souvent les métho-

TABLEAU I

Variations en extrait total, acidité totale, malique et lactique de 5 vins avant et après traitement par électrodialyse

Valeurs analytiques pour	Vins										Baisse moyenne (g/l)
	A		B		C		D		E		
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	
	le traitement par électrodialyse										
Extrait total (g/l)	22,2	20,1	21,9	21,6	22,2	20,6	21,6	20,6	21,1	20,9	—
Baisse (g/l)	— 2,1		— 0,3		— 1,6		— 1,0		— 0,2		1,0
Acidité totale (g/l)	7,8	7,5	7,9	7,7	7,8	7,6	—	—	—	—	—
Baisse (g/l)	— 0,3		— 0,2		— 0,2		—		—		0,23
Acide malique (g/l)	2,5	2,5	—	—	2,5	2,4	2,4	2,1	1,9	1,8	—
Baisse (g/l)	— 0		—		— 0,1		— 0,3		— 0,1		0,16
Acide lactique (g/l)	—	—	—	—	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,4	—
Baisse (g/l)	—		—		0		0		— 0,1		0,03

TABLEAU 2

Variations de la teneur en potassium, acide tartrique, cendres, alcalinité des cendres, sulfate de potassium, SO_2, de 5 vins avant et après traitement par électrodialyse

Valeurs analytiques pour	Vins										Baisse moyenne (mg/l)
	A		B		C		D		E		
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après	
	le traitement par électrodialyse										
Potassium (mg/l)	835	730	835	715	835	722	838	763	838	739	
Baisse	— 105		— 120		— 113		— 75		— 99		106
Acide tartrique (g/l)	2,1	1,9	2,3	1,8	2,1	1,8	2,1	2,0	2,0	1,8	
Baisse	— 0,2		— 0,5		— 0,3		— 0,1		— 0,2		260
Cendres (g/l)	2,14	1,78	2,06	1,74	2,14	1,92	2,08	1,92	2,08	1,78	
Baisse	— 0,36		— 0,32		— 0,22		— 0,16		— 0,30		270
Alcalinité des cendres ml NaOH N	28,3	24,3	26,6	23,3	28,3	25,0	27,3	25,3	27,3	24,0	
Baisse	— 4,0		— 3,3		— 3,3		— 2,0		— 3,3		3,18
Sulfate de potassium (mg/l)	414	315	335	307	414	330					
Baisse	— 99		— 28		— 84		—		—		70,3
SO_2 total (mg/l)	128	112	124	105	128	96	156	118	156	105	
Baisse	— 16		— 19		— 32		— 38		— 51		31

des d'analyse ne sont pas suffisamment exactes pour que les résultats correspondent, aux fractions de grammes et de milligrammes près, exactement aux proportions réelles.

Le tableau 1 montre que l'extrait total des vins baisse en moyenne d'1 g/l quand on enlève 100 mg/l de potassium et les anions correspondants par électrodialyse.

100 mg/l de potassium correspondent théoriquement à environ 0,5 g/l de tartre, si bien qu'à un abaissement théorique de 0,5 g/l d'extrait total s'oppose un abaissement réel de 1 g/l. L'abaissement de la teneur moyenne en acidité totale correspond à peu près à la baisse d'acidité due à la cristallisation du tartre. Les modifications de la teneur en acide malique et en acide lactique sont relativement faibles et relativement peu importantes pour le vin. Les données analytiques des 5 vins qui ont subi des changements relativement grands sont représentées dans le tableau 2.

Ce tableau montre que par électrodialyse on parvient à faire baisser en moyenne la teneur en potassium de 100 mg/l, grâce à quoi le vin devient stable du point de vue tartrique. Si ces 100 mg/l de potassium avaient précipité sous forme tartrique, la teneur en acide tartrique aurait dû baisser de 390 mg/l. En fait elle ne baissa que de 260 mg/l, c'est-à-dire seulement des 2/3 de la quantité d'acide tartrique qui aurait précipité par refroidissement. A la place des 130 mg/l d'acide tartrique manquants, des anions correspondant à environ 33 mg de potassium sont extraits du vin (parmi lesquels les ions sulfates en grande majorité, ainsi que les ions sulfite, phosphate).

Après avoir établi que l'on ne peut remplacer dans le vin l'anhydride sulfureux que par l'acide lactique, un vin au taux excessif d'anhydride sulfureux de 298 mg/l fut soumis à l'électrodialyse. Après des temps de traitement de 90, 180 et 270 minutes, le vin fut analysé. Les caractéristiques établies alors sont rassemblées dans le tableau 3. Celui-ci donne en même temps des indications sur la composition du liquide accepteur. Nous voyons qu'après 4,5 heures de temps d'activité, la teneur en anhydride sulfureux total est passée de 298 mg/l à 175 mg/l, soit une diminution de 41 p. 100. L'anhydride sulfureux libre tombe de 31 mg/l à 13 mg/l, soit une diminution de 68 p. 100. Les substances combinées à SO_2, l'acétaldéhyde et le pyruvate, diminuent dans une fourchette de 41 à 66 p. 100. Le taux d'acidité totale reste pratiquement constant.

Comme prévu, la teneur en acide lactique augmente d'environ 2 g/l. Le taux d'acide tartrique diminue de 22 p. 100, celui de l'acide malique de 21 p. 100, celui du sulfate de 64 p. 100 et celui du phosphate de 35 p. 100. La teneur en cendres diminue de 13 p. 100, conséquence du départ des ions sulfates du vin. La teneur en potassium diminue de 11 p. 100, entraînant aussi une légère baisse de l'alcalinité des cendres. Les teneurs en sodium et en calcium restent pratiquement inchangées.

En conclusion, l'essai montre que l'on peut diminuer dans un vin une teneur excessive en anhydride sulfureux par électrodialyse, réussissant à l'amener à moins de 200 mg/l, quantité acceptable du point de vue de la physiologie alimentaire. En ce qui concerne la teneur en acidité totale, le pH, la teneur en cendres, etc., la constitution du vin ne s'en trouve pas changée. Toutefois, la teneur en acide lactique, qui est aussi un composant naturel de bien des vins, est augmentée. Mais lors de ce processus 20 p. 100 environ des acides tartrique, malique, citrique et phosphorique sont également échangés contre de l'acide lactique. La teneur en sulfate de potassium qui ne joue aucun rôle dans la qualité du vin diminue de façon importante : malate, lactate et de très petites quantités d'ions volatils.

Des essais de réfrigération montrèrent qu'un abaissement de 100 mg/l de

TABLEAU 3

Variations des valeurs analytiques d'un vin et du liquide accepteur lors de l'élimination de SO_2 par électrodialyse à l'aide d'une solution d'acide lactique 0,1 M avec des temps d'action de 90 180 et 270 minutes.

	Vins				Liquide accepteur 270
	Temps d'action en minutes				
	0	90	180	270	
SO_2 total (mg/l)	298	266	219	175	102
SO_2 libre (mg/l)	31	42	24	13	51
Acétaldéhyde (mg/l)	130	108	97	91,6	36
Pyruvate (mg/l)	29	19	15	10	2
Acidité totale (g/l)	9,2	9,1	9,1	9,1	7,6
Acide tartrique (g/l)	2,54	2,44	2,31	1,97	0,5
Acide malique (g/l)	4,8	4,5	4,1	3,8	0,6
Acide acétique (g/l)	271	257	241	232	39
Acide lactique (g/l)	0,003	0,783	1,472	1,922	5,207
Sulfate de potassium (mg/l)	500	397	311	181	224
Cendres (g/l)	2,49	2,34	2,25	2,16	0,22
Alcalinité des cendres en ml NaOH (N/l)	24,7	24,0	23,0	21,3	1,7
Potassium (mg/l)	1 088	1 038	1 029	971	27
Calcium (mg/l)	86	84	89	90	26
Sodium (mg/l)	18	19	19	19	14
pH	3,41	3,44	3,46	3,47	2,6
Composés phénoliques totaux (mg/l)	384	380	350	326	5

la teneur en potassium amenait une stabilité tartrique pratiquement absolue. Les vins ont un taux moyen de 800 mg/l de potassium; celui-ci régressa lors de nos essais à 700 mg/l, valeur qui pour des vins peut être considérée comme parfaitement normale. Si par la précipitation du tartre on abaissait le taux de potassium d'un vin de 100 mg/l, la teneur en acide tartrique s'en trouverait alors théoriquement abaissée de 0,39 g/l; lors de nos essais, l'abaissement ne se chiffrait en moyenne qu'à 0,30 g/l, si bien que le procédé de l'électrodialyse ne correspond pas tout à fait à la précipitation naturelle du tartre; il s'en rapproche cependant bien plus qu'un traitement par les sels de calcium ou par échange d'ions au cours desquels on abaisse seulement soit le taux d'acide tartrique soit celui du potassium.

Abaissement de la teneur en anhydride sulfureux par électrodialyse

Pour réduire la teneur en anhydride sulfureux dans les vins on peut essayer de leur en ajouter une quantité moindre; mais il ne faut pas non plus négliger la possibilité de diminuer le taux de SO_2 en le séparant du vin dans une certaine mesure avec les substances auxquelles il est combiné. Le procédé de l'électrodialyse est tout indiqué pour cela, puisqu'il permet de réaliser non seulement une déminéralisation, mais aussi un échange d'ions dans des solutions électrolytes. Pour cela,

l'installation d'électrodialyse nécessite cependant un montage spécial : il faut installer un troisième, et éventuellement un quatrième circuit liquidien et disposer les membranes suivant un montage spécial.

Nous avons alors essayé de remplacer l'anhydride sulfureux par d'autres anions avec la disposition décrite. Il s'avéra que l'anhydride sulfureux partit réellement du vin avec les substances qui lui étaient combinées : l'acétaldéhyde et surtout le pyruvate; mais que le processus dépendait beaucoup du choix du liquide donneur employé. Après une série d'essais il s'avéra que seul l'acide lactique employé comme liquide donneur ne provoquait aucun changement important dans la composition analytique du vin.

Summary

Possibles applications of procedures utilizing membranes for the stabilization of wines (ultrafiltration, inverse osmosis electrodialysis)

Solutions may be deprived of or enriched with dissolved substances by certain procedures involving the use of membranes: pressurized filtration across a membrane and electrodialysis.

Membrane procedures can be used advantageously in the preparation of fruit juices and in winemaking. For example grape must can be concentrated by inverse osmosis. Musts enriched in this way are the basis of superior quality wines. With fermentation accomplished wine colour can be brightened by ultrafiltration -a procedure which eliminates condensed and oxidized polyphenols. Large protein molecules may also be eliminated this way rendering a bentonite treatment unnecessary.

Potassium bitartrate in the must and wine can be stabilized by inverse osmosis and by electrodialysis. During inverse osmosis ethanol crosses the membrane to the same extent as water: this procedure can therefore also be used for the partial de-alcoholization of beer and wine. Being able to replace one type of ion by another type using electrodialysis means a portion of the sulphuric acid and the substances to which it combines in the wine can be eliminated.

Key-words: *Musts — Wine — Stabilization — Membranes — Inverse osmosis — Ultrafiltration — Electrodialysis.*

Références bibliographiques

DICKINSON B. N., STONEMAN G. F., 1958. Stabilisation of Wines by Ion Exchange, *113th Meeting Amer. Chem. Soc. Div. Agric. Food Chem.*, San Francisco, 15 avril.

HELFRICH F. G., 1962. *Ion Exchange*, Mc Graw-Hill, New-York.

LACEY R. E., 1972. The costs of reverse osmosis *in Industrial Processing with Membranes*, LEASING R. E. *et al.*, Wiley-Interscience, New York, 179-189.

LOEB S., SOURIRAJAN S., 1960. Sea water demineralization by means of a semipermeable membrane, *UCLA Water Resources Center Rep. WRCC*, 34.

LONSDALE H. K., 1972. Theory and practice of reverse osmosis and ultrafiltration *in Industrial Processing with Membranes*, LACEY R. E. *et al.*, Wiley-Interscience, New York, 123-178.

MANEGOLD E., KALAUCH K., 1939. *Kolloid-Z.*, **86**, 313.

MANJIKIAN S., 1967. Desalination membranes form organic casting solutions, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, **6**, 23-32.

MEYER K. H., STRAUSS W., 1940. *Helv. Chim. Acta*, **23**, 795.

NEUBERT S., 1971. Uber das Prinzip der umgekehrten Osmose und ihre Anwendungsmöglichkeit zur Konzentrierung und Entsäuerung von Traubenmost und Wein, *Dipl. Landwirtschaftlichen Fakultät der Justus Liebig Univ.*, Giessen.

PAULI W., 1942. *Helv. Chim. Acta*, **25**, 137.

PEYNAUD E., ALLARD J. J., 1970. Concentration des moûts de raisin par osmose inverse, *C. R. Acad. Agric.*, **56** (18), 145-148.

RENTSCHLER H., HAUSE F., 1953. Uber die Ausscheidung von Weinstein aus Traubensäften und Weinen und ihre Verhinderung, *Scheweiz. Zeitschr. Obst-und Weinbau*, **62**, 308.

SOURIRAJAN S., 1964. Characteristics of pourous cellulose acetat membranes for the Separation of some inorganic salts in aqueous solution, *J. Appl. Chem.*, 513-606.

TROOST G., 1955. Kellerwirtschaftliche Möglichkeiten zur Gûtebeeinflussung kleiner Jahrgänge, *Deutsche Weinzeitung*, **91**, 88-92.

UNGER R., 1964. Ionenaustauscher und ihre kellertechnische Bedeutung, *Diss. an der Johan Wolfgang Goether-Univ.*, Frankfurt/Main.

WEGER B., 1957. Die Verhinderung des Weinsteinausfalls durch Metaweinsâure, *Mitt. Klosterneuburg*, **7**, 246-248.

WORLEY N., 1970. Reverse osmosis plant, *Chem. Ind.*, 352-357.

WUCHERPFENNIG K., 1970. Uber die Entwicklung auf dem Gebiet des Baues von Konzentratanlagen und über die Einsatzmöglichkeiten von Tra-bensaftkonzentraten in der Kellerwirtschaft, *Die Wein Wissenschaft*, **25**, 155-180.

WUCHERPFENNIG K., RATZKA D., 1967. Uber die Verzögerung der Weinsteinausscheidung durch polymere Substanzen des Weines, *Weinberg und Keller*, **14**, 499-509.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 333-334

INTERVENTION

Un nouveau procédé de prévention des précipitations de bitartrate de potassium « le procédé de contact »

H. MÜLLER-SPÄTH

Bad-Kreuznach (Bundesrepublik Deutschland)

La solubilité du bitartrate de potassium dépend du pH, de l'alcool et de la température du vin. Par refroidissement on diminue le seuil de solubilité, la précipitation doit suivre et le vin devrait être stable. Malheureusement ce n'est souvent pas le cas parce qu'il y a des inhibiteurs qui interviennent et évitent la cristallisation. Voilà la raison pour laquelle il se trouve que dans les vins traités par la méthode conventionnelle du froid on rencontre assez souvent des cristaux.

Les résultats de plus de 400 essais ont montré l'efficacité du « procédé de contact ». Après avoir étudié les règles de cristallisation nous avons constaté qu'il est nécessaire d'offrir une grande surface de cristaux au vin à traiter. Les essais ont montré que la quantité optimale de cristaux se situe à environ 4 g/l. Au début nous avons cru qu'il fallait cette quantité de cristaux en solution vraie pour former ensuite les microcristaux. Très vite les résultats nous ont amenés à constater que la phase d'induction n'est pas nécessaire pour la cristallisation. La précipitation se fait à partir du moment où les microcristaux sont formés. Au lieu de dissoudre la quantité de bitartrate nécessaire, nous avons ajouté les cristaux dans le vin se trouvant à la température de stabilisation.

Le contrôle de la diminution de l'acide tartrique et en conséquence du tartre peut se faire par mesure de la résistivité. L'influence des inhibiteurs est pratiquement négligeable. La gomme arabique n'a pas d'influence notable. L'acide métartrique échappe complètement à l'effet du procédé de contact. C'est seulement après avoir hydrolysé l'acide métatartrique par la chaleur que le procédé est pleinement efficace. Quant à la température de stabilisation, il suffit de refroidir le vin à $\pm$ 0 °C. Selon les conditions données le traitement peut être appliqué à la température d'environ + 5 °C (fig. 1).

Les frigories sont récupérées après un traitement d'environ 60 minutes.

Par comparaison à la méthode classique, les frais de traitement du procédé de contact se situent entre le quart et la moitié.

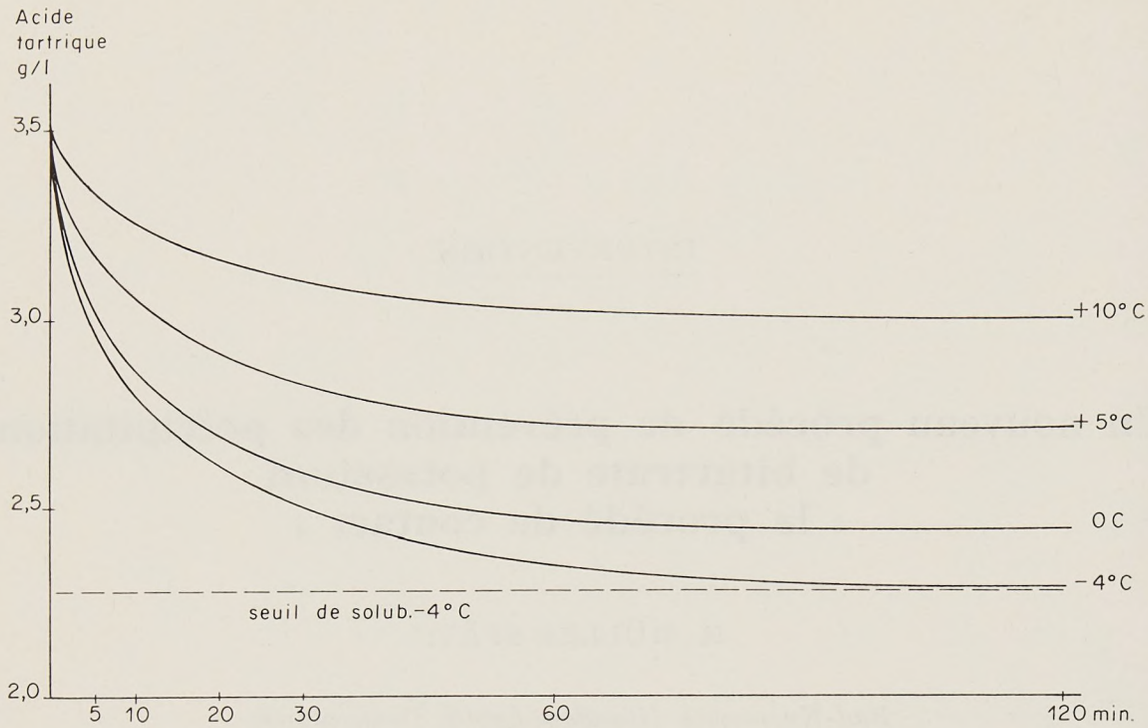


FIG. 1. — *Procédé de contact.*

Addition de 4 g/l de cristaux.
Diminution de l'acide tartrique.
Vin de table 1976 du marché commun.
Alcool : 8,95 vol. %.
Acide tartrique : 3,5 g/l.
pH : 3,22.
Refroidissement classique 6 jours — 4 °C.

Le procédé

— Vin blanc ou vin rouge filtré clairement.
— Refroidir à la température de stabilisation 0 °C à + 5 °C.
— Agiter constamment.
— Doser env. 4 g/l de tartre de contact. Morceaux de cristaux d'une grandeur définie.
— Durée de contact environ 60 minutes.
— Séparation des cristaux à la température de stabilisation.
— Broyer les cristaux séparés.
— Enlever le reste des cristaux par filtration.
— Récupérer les frigories du vin filtré en échange avec le vin à traiter.

Autres détails

— Le tartre propre à l'entreprise est traité pour être utilisé de nouveau.
— Une partie du tartre sera vendue comme produit secondaire.
— A l'état sec le tartre n'est guère menacé microbiologiquement.
— A l'état humide ou mouillé la conservation peut être faite avec de l'acide sulfureux.

Définition et appréciation de la qualité

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 337-347

Les critères de la qualité des vins

E. PEYNAUD

Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux (France)

Résumé

La définition de la qualité d'un vin ne peut être que relative, car la qualité n'existe qu'en fonction de l'aptitude du consommateur à la percevoir et à la juger. Aussi beaucoup d'auteurs ont exprimé la difficulté de définir et d'analyser les facteurs de la qualité. Les conditions dites naturelles ne sont que potentialité; elles ont été choisies par l'homme et c'est seulement lui qui recherche et réalise la qualité. La qualité est relative encore parce qu'on doit tenir compte du type de vin et de sa place dans la hiérarchie.

Les critères de la qualité ont été souvent définis. La qualité est d'abord l'absence de défaut et les caractères organoleptiques ont toujours la première place, car le vin est d'abord jugé par le plaisir que donne sa consommation. L'analyse chimique est un soutien efficace de la dégustation, mais elle ne saurait la remplacer. On fait encore intervenir les qualités hygiéniques; une saine œnologie permet d'écarter les traitements trop spoliateurs et de diminuer les doses des additifs indispensables.

La qualité est garantie à la consommation par les différents contrôles que subit le vin depuis son élaboration jusqu'à son conditionnement en bouteille. Les contrôles réglementaires assurent l'authenticité et une qualité minimale grâce à la mesure analytique de normes de constitution et à l'appréciation organoleptique. Le contrôle technique de la qualité se développe de plus en plus dans les entreprises qui préparent la distribution en bouteille. A l'analyse et à la dégustation, s'ajoutent dans ce contrôle les essais microbiologiques, les tests de stabilité et la qualité de la présentation.

Nous essayons de démontrer dans ce rapport que tous les aspects de la qualité sont du domaine propre de l'œnologie.

Mots clés : *Vins — Qualité — Critères — Contrôle.*

Quelques définitions de la qualité

Pour parler de la qualité des vins, on fait souvent usage d'un ensemble d'expressions et d'aphorismes, de lieux communs. On parle de qualité (bonne ou mauvaise) d'un vin, on parle d'un vin de qualité, d'une production de grande qualité. Mais un vin ordinaire peut être de bonne qualité et un vin dit de qualité peut être médiocre. Le mot qualité désigne donc soit la manière d'être d'une chose, ses

propriétés particulières, soit une supériorité, une excellence. Il existe des « Vins de qualité supérieure », des « Vins de qualité » produits dans des régions déterminées ». On distingue les diverses qualités d'un vin : organoleptiques, hygiéniques, pharmacodynamiques, etc. On parle d'une politique de la qualité, d'un contrôle de la qualité. On utilise volontiers des expressions toutes faites : « La recherche constante de la qualité », « Avoir le souci de la qualité », « Etre condamné à la qualité », « Le salut de la viticulture est dans la qualité », et si l'on est commerçant ou acheteur on évoque « le rapport qualité-prix ».

Beaucoup d'auteurs ont exprimé la complexité de la définition de la qualité. C'est la même idée que l'on retrouve chez PISANI (1975). « La qualité se constate plutôt qu'elle ne se définit », chez POUPON (1975) : « La qualité d'un vin s'éprouve plus qu'elle ne se prouve », chez AMERINE et ROESSLER (1976) : « Quality in wines is much easier to recognize than to define », chez PARONETTO (1976) : « La qualita del vino e una caratteristica difficile da definire in maniere complematente univoca », ou encore chez RIBÉREAU-GAYON (1977) lorsqu'il écrivait : « La qualité est une réalité, mais qu'il est difficile de juger d'une manière sûre et d'exprimer en un langage exact et clair, le même pour tous ».

LARREA (1956) a une définition très simple et très claire parce qu'elle est évidente : « La qualité d'un vin est l'ensemble de ses qualités, c'est-à-dire de ses propriétés qui le rendent acceptable ou désirable ». D'où l'importance dans le jugement de la qualité, du plaisir, tout subjectif, que procure la consommation du vin :

« Le vin fait partie de la catégorie des aliments pour lesquels le goût est le facteur de choix et auxquels le consommateur attribue en outre une valeur affective, symbolique... » (CORDONNIER, 1977).

« La qualité est ce qui fait plaisir dans la consommation ou l'utilisation d'une marchandise... On s'alimente certes par besoin, mais aussi par plaisir » (QUITTANSON, 1976).

« La qualité est aujourd'hui liée surtout à l'aspect organoleptique, voire simplement gustatif. Couramment on dit d'un vin qu'il est « bon » s'il est agréable à la vue, à l'odorat et principalement au goût; il s'agit d'une qualité « apparente », sensorielle » (BOURZEIX, 1976).

Les références citées ont été choisies parmi les plus récentes. On pourrait allonger cette liste des définitions. Bien des personnes qui se réfèrent souvent à la qualité mesurent mal ce qu'elle représente en réalité et les efforts qui sont nécessaires pour l'obtenir.

La qualité et le consommateur

Derrière chaque définition se profile ou se cache celui qui, en dernier ressort, juge la qualité, l'homme qui boit le vin. La qualité n'existe que par rapport à ce personnage, qu'en fonction de son aptitude à la percevoir et à la sanctionner. Elle dépend de son jugement, c'est-à-dire de son goût, de son plaisir, de sa préférence. On conçoit la relativité de la notion de qualité :

« La qualité en elle-même est une notion théorique qui ne signifie rien sur le plan pratique... Il s'agit d'une notion essentiellement relative... Elle dépend de nombreux facteurs parmi lesquels les conditions d'environnement du consommateur jouent un rôle prépondérant » (DEBRY, 1976).

« La qualité n'est pas une chose; elle n'a pas d'existence par elle-même... Elle

est une conception mentale qui cherche à établir une classification et une hiérarchie» (ROUBERT, 1976).

« La calidad es un concepto que indica simplemente una preferencia del consumidor hacia un producto, sugestionado por una moda o una propaganda » (LARREA, 1976).

DEBRY (1976) a bien défini ce qui est positif et ce qui est relatif dans la qualité du produit consommé : « La qualité d'un aliment se définit par le pouvoir gratifiant (qui donne quelque chose de plus, un supplément) qu'il représente pour l'organisme. La qualité est une notion positive et relative, positive parce que l'aliment apporte à l'organisme une satisfaction de ses besoins, relative parce que cette satisfaction dépend de l'organisme considéré et de ses besoins propres ».

COSTE (1968) a tenté un essai de classification universelle et rationnelle des vins. Son intérêt est qu'il délimite et fait correspondre une catégorie de consommateurs et une catégorie de vins. Ce classement original discerne les catégories suivantes :

Première catégorie : le « vin-boisson », bu sans être goûté, consommé en fonction de l'habitude, défini par les professionnels par l'expression « sans vice ni vertu » il correspond à une clientèle non éduquée, inattentive, le plus souvent insensible; ou indifférente aux perceptions organoleptiques, confondant le pire et le meilleur, semblant intéressée seulement par la sensation de bien-être que procure l'ingestion d'un mélange éthylique.

Deuxième catégorie : « le faux bon vin », qui peut être de bonne origine et élevé selon les règles, et qui fait ainsi illusion; il présente des défauts généralement techniques (pour un vin rouge : dureté, astringence, goût de vieux bois, acidité fixe ou volatile élevée, taux d'acétate d'éthyle important, etc; pour un vin blanc : perte de fruité, oxydation, odeur d'anhydride sulfureux, etc); le consommateur de tels vins a des moyens mais n'a pas de formation; s'il connaît appellation et millésime, il lui manque la compétence; c'est un « buveur d'étiquettes »; il est très vulnérable aux arguments publicitaires (le produit le plus vendu est forcément le meilleur).

Troisième catégorie : le bon vin, net, bien structuré, coulant, simple mais agréable et facile à boire, généralement consommé jeune, à saveur de fruit; le client est connaisseur, il est sensible à un vin évoquant une écologie de rêve, un souvenir de vacances, « l'atmosphère paisible des champs, la grâce des paysages viticoles, la traditionnelle gaîté du folklore vineux »; c'est lui qui fait le succès actuel du vin « jus de fruit », du vin primeur, du vin blanc aromatique.

Quatrième catégorie : le grand vin, œuvre d'art, complexe, personnel, riche en principes sapides et odorants, échappant à la description et d'autant plus attachant à déguster; il lui faut pour s'exprimer un heureux concours de circonstances et la rencontre préparée avec l'amateur averti, attentif, réceptif.

Pour COSTE, c'est en quelque sorte la qualité du consommateur qui fait la qualité du vin qu'il boit; chacun boit le vin qu'il mérite; sans consommateurs éclairés, pas de grands vins. Certains ont poussé plus loin le paradoxe : « La qualité du vin n'existe pas, puisqu'elle dépend de la qualité du consommateur ». Peut-être, mais il y a dans un vin une qualité potentielle d'autant plus certaine qu'elle peut être reconnue par le plus grand nombre, qu'elle peut être définie par les connaisseurs. Ce sont ces derniers qui font les réputations. On a dit encore avec juste raison que l'information et l'éducation des consommateurs, en les rendant plus exigeants, sont des moyens efficaces pour améliorer, par contre-coup, la qualité des vins.

Les conditions naturelles et humaines de la qualité

C'est le titre même de ce symposium et les notions qui définissent la part de l'homme dans une production de qualité découleront précisément de la synthèse des différents rapports. On a défini depuis longtemps les conditions de l'obtention de la qualité. OLIVIER DE SERRES les nommait déjà au début du XVIIe siècle : « l'air, la terre et le complant ». On y ajoutait parfois accessoirement l'action de l'homme. Les trois premières conditions correspondraient aux facteurs naturels, au don de la nature, aux éléments de « la qualité innée »; l'intervention de l'homme apportant « la qualité acquise » (PISANI, 1975). Tout cela est vrai, mais nous voudrions faire remarquer que rien n'est tout à fait inné dans un produit de transformation d'origine agricole. Les conditions dites naturelles ne sont que des virtualités. « Un vignoble porte en lui une certaine potentialité de qualité; mais cette qualité possible ne sera pleinement obtenue que si l'homme intervient à bon escient pour réaliser les conditions favorables » (RIBÉREAU-GAYON, 1974). En fait tout a dû être acquis, découvert, inventé. Bien sûr cette œuvre a duré des siècles et il est difficile d'imaginer de nos jours les conditions de la création du patrimoine viticole dont nous avons hérité. Mais on ne peut pas raisonner comme si la vigne était une végétation spontanée, comme si le vin coulait de source.

Le climat et la terre : ce sont le site et le lieu d'origine; il ne faut pas oublier qu'ils ont été choisis par l'homme entre des milliers de situations différentes, que le terrain a dû être constamment maintenu et entretenu, que sans drainage et amendement il n'y aurait pas de bons sols à vigne, pas de production de bons raisins et pas de vins de qualité.

C'est l'homme qui dans telle situation a choisi le cépage adapté au sol et au climat, qui ailleurs a mélangé judicieusement plusieurs variétés; il a su donner ainsi au vin d'un terroir qualité et originalité. Les cépages ont été améliorés par sélection. Pour conserver et faire produire la vigne, une des plantes les plus fragiles et les plus agressées, l'homme a dû créer des modes complexes de culture, de conduite, de protection. Au fond, rien de moins naturel que le cep de vigne d'un vignoble de qualité dans sa forme et sa production. Serait-on en droit de dire que la science viticole, si complexe, si multiple, si affinée, résultat d'une somme considérable de connaissances et de travaux, est un simple don de la nature?

Quant au vin, il est directement le produit du travail de l'homme. Le vin n'est pas tout le raisin; il est obtenu à partir d'une extraction fractionnée des substances solubles contenues dans différents tissus de la baie. La qualité du vin dépend du choix d'un mode d'extraction et de sa réalisation. On ne retient dans le vin ni tous les acides du raisin, ni tous les sels minéraux, ni tous les constituants aromatiques; dans la vinification en blanc on évite généralement la dissolution des composés phénoliques; dans la vinification en rouge, on n'extrait que 20 à 30 p. 100 de ceux qui existent dans les pellicules et les pépins. Le type du vin, et dans ce type sa qualité, sont en rapport entre autres facteurs de la vinification, avec la manière dont est dirigé ce fractionnement. Le mode de conduite de la fermentation alcoolique influe sur le produit fini. L'intervention des bactéries malolactiques est aussi un choix de qualité. Les conditions de la conservation, sa durée, les modes de clarification, de stabilisation confèrrent encore une qualité supplémentaire. Autre exemple de qualité potentielle : certains vins n'expriment l'originalité de leur caractère et leur agrément qu'après un temps suffisant d'élevage et de vieillissement. Au fond la qualité n'existe que si elle est voulue, recherchée;

il ny a pas dans ce domaine de don gratuit. Nous ne saurions être d'accord avec la phrase suivante : « On est amené à admettre l'intervention humaine tant qu'elle laisse subsister les caractères naturels », puisque c'est précisément l'intervention humaine qui a créé ces caractères dits naturels.

La qualité est relative encore parce que pour juger un vin, on doit tenir compte de son type, de sa classe, de son âge, de sa place dans la hiérarchie. Tout vin est codifié par un système de réglements mis en place pour éviter que soient confondus des vins ayant des mérites différents. La doctrine de la classification tient compte des conditions de production et de commercialisation et est forcément différente d'un pays à un autre. Elle n'est pas seulement géographique. D'autres particularités telles que le cépage (les vins de Riesling, de Sauvignon, de Cabernet-Sauvignon, etc... ont par exemple une bonne notoriété), la méthode de cueillette (Auslese, Spätlese), le mode de vinification (vins rosés, vins mousseux, vins enrichis en alcool), l'âge (dans certains pays les vins « finos » sont ceux qui ont au moins un an de vieillissement, et les « vins de réserve », ceux qui ont cinq années de garde) peuvent aussi servir de bases à une classification.

On ne peut réaliser un vin de grande qualité que dans des conditions où on peut bénéficier d'un niveau technique élevé de la production viticole, de la vinification, de la conservation et de la distribution, et qu'existe une clientèle éduquée capable d'apprécier et décidée à payer une plus-value qualitative.

A ce sujet ce serait une erreur de penser que la qualité peut s'obtenir sans investissements et sans efforts supplémentaires. Le principal obstacle à une promotion de la qualité dans une région donnée est précisément le fait que la qualité souvent « ne paie pas ». Il est logique qu'un vin meilleur se vende plus cher, et il faut faire en sorte qu'il se vende plus cher, ou il n'y a pas intérêt à faire un vin meilleur.

Le rôle essentiel de la technique œnologique

La qualité du vin est du domaine de l'œnologie. ROUBERT (1976) montre que seul l'œnologue a compétence pour promouvoir et assurer la qualité. Le vin étant un produit destiné à être vendu et consommé, sa qualité est sous la dépendance du travail du producteur, du choix que fait le commerçant, et est finalement jugée par le consommateur. Or, remarque ROUBERT, le producteur parle plus de qualité qu'il ne s'en occupe, ce n'est pas toujours la qualité la meilleure qui rapporte le plus au négoce, et le consommateur est souvent versatile, influençable; il juge par le prix, par la marque, l'étiquette, qui sont des données sûres, plus que par les qualités organoleptiques qui demandent éducation et expérience. Le maintien de la qualité est donc surtout entre les mains de l'œnologue vinificateur ou conseiller du commerce.

Même profession de foi de la part de BRUGIRARD (1976) : « L'œnologue surveille et dirige l'évolution naturelle du vin, il intervient pour éviter les déviations contraires à la qualité; son souci est d'augmenter les qualités organoleptiques des vins et de conserver toutes leurs qualités hygiéniques ». Même doctrine exprimée par PARONETTO (1976) : « L'œuvre de l'œnologue est de contribuer toujours de manière déterminante à la réalisation, à la promotion, à l'évolution et éventuellement à la conservation de la qualité ».

Dans la dernière édition de leur traité d'œnologie, RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1975) ont développé en plusieurs pages le problème scientifique et technique de

la qualité. On peut résumer ces paragraphes de la façon suivante. Le but d'une saine œnologie est d'aider le producteur à obtenir le meilleur vin possible, possèdant toute la qualité qui était inscrite dans les raisins d'où il est issu. Ce problème est d'autant mieux résolu que l'on connaît mieux le vin, ses constituants, les transformations qu'ils subissent, c'est-à-dire que la science du vin est plus avancée et que ses données sont mieux appliquées. Cela suppose des recherches qui fondent une saine doctrine œnologique, correctement adaptée aux divers types de vins, et cela suppose un enseignement, une diffusion des notions techniques essentielles.

Il est d'autant plus nécessaire d'insister sur ce problème qu'il existe une certaine tendance à considérer que la qualité est indépendante de la technique œnologique. Pour renforcer les qualités naturelles du vin, on minimise le rôle de l'homme. Dans cette optique l'œnologie donnerait bien les moyens d'éviter les accidents de fermentation et de conservation, mais elle ne saurait saisir les fines qualités des grands vins, ni en réaliser les conditions, liées à des circonstances subtiles et indéfinissables. Pourtant l'œnologie a pour but pratique de rechercher et de réaliser toutes les conditions qui permettent le plein développement de la qualité, de toutes les qualités, aussi bien les plus délicates et les plus fines que la simple absence d'altération. En réalité la qualité maximale, le respect de tous les caractères que l'on apprécie dans un bon vin sont la préoccupation constante du véritable œnologue et le but pratique de son activité

Larrea (1956) a bien exprimé cette vocation de l'œnologie à la qualité : « En traitant de la qualité des vins, il faudrait reproduire le contenu de presque tous les travaux, communications et livres qui existent sur l'œnologie puisque, en réalité, tous sont orientés dans le sens d'une amélioration ou d'une élimination d'un défaut du vin, en somme d'une qualité meilleure ».

Les critères de la qualité

Les critères de la qualité ont été souvent étudiés. On a distingué un côté « négatif », qui est l'absence de défauts, qui correspond à un seuil de qualité minimale, et un côté « positif » qui concerne les qualités réelles : agrément, plaisance, complexité, originalité, pureté. Les défauts sont plus aisément perceptibles que les qualités. Les consommateurs ne savent peut-être pas toujours apprécier les qualités d'un vin, mais par contre ils sont très capables d'en reconnaître les défauts. Ils se contentent souvent d'un vin sans qualité pourvu qu'il n'ait pas de défaut apparent.

Quittanson (1976) voit deux catégories de critères de la qualité :

— Des critères objectifs, qu'il étudie longuement et qui sont des critères réglementaires, toujours améliorés par des normes et des textes plus précis, plus contraignants. Depuis le début du siècle, les étapes successives de l'établissement de ces critères furent la définition officielle du vin, la réglementation de la production, les mesures de protection de la politique de qualité par la codification des pratiques de vinification, de conservation, de traitements, et par les interdictions et les limitations.

— Des caractères subjectifs (« la qualité, comme la vérité, est avant tout subjective »). Ce sont ceux que l'on ne mesure pas, ou que l'on ne mesure pas encore; ils sont souvent le résultat d'équilibres difficiles à chiffrer. Ils se définissent surtout par la satisfaction du consommateur Ce sont les caractères organoleptiques : aspect, odeur, saveur et la dégustation est l'unique moyen de les apprécier.

On pourrait faire remarquer qu'en matière de qualité, la distinction entre ce qui est objectif et ce qui est subjectif est toujours malaisée. La qualité de l'objet est déterminée par rapport au sujet qui doit la juger. Ainsi les critères objectifs pourraient se rapporter à l'objet et les critères subjectifs à la personnalité du sujet, mais, nous l'avons vu, ils sont étroitement imbriqués. On a parlé aussi de qualités vraies, réelles, mesurables, dans le premier cas, imaginaires dans le second. Mais la qualité d'un vin perçue par la dégustation est une notion très réelle. PUISAIS, dans son rapport à ce Symposium, s'élève contre le qualificatif « subjective » associé à l'appréciation organoleptique. Il y a en réalité des degrés plus ou moins grands d'objectivité dans l'appréciation de la qualité gustative, suivant la manière de la définir. C'est la « qualité » du goûteur qui donne ses limites à cette objectivité. CORDONNIER (1977) l'exprime de la façon suivante : « La qualité que l'on attribue à un vin est en quelque sorte la réponse intégrée au niveau cérébral à un mélange de composés volatils et fixes en proportions définies. Ce qui constitue le facteur critique de la qualité, ce sont les proportions relatives de ces divers constituants considérés individuellement. Encore faut-il ajouter des facteurs d'ordre psychologique, puisque le jugement définitif sur la qualité se fera en référence à un témoin mémorisé ou à travers un conditionnement (culture, habitude, environnement). »

Il n'y a pas toujours unanimité dans les avis d'une équipe de dégustateurs professionnels. Dans une dégustation d'une vingtaine de vins comparables, les notes et les commentaires concordent pour une quinzaine d'entre eux; elles peuvent être très divergentes pour les cinq autres. Le goût personnel intervient; il dépend de la formation, de l'importance accordée à tel défaut ou à telle qualité, de l'image mémorisée forcément différente d'un dégustateur à un autre, représentant les normes gustatives du même type de vin. C'est la justification du travail de dégustation en équipe. Si l'accord était toujours évident, un seul dégustateur suffirait.

L'origine et la réglementation

Le rôle essentiel des connaissances techniques de l'homme est implicitement reconnu par la réglementation. Il est admis que la qualité n'est pas donnée automatiquement par l'origine, puisqu'on a recours de plus en plus à un contrôle gustatif, mais l'origine est reçue communément comme un élément de qualité. Le contrôle gustatif s'effectue quelques mois après la récolte, au moment où le vin est loin d'être achevé; il est appelé à évoluer, souvent profondément, dans un sens ou dans un autre. Le président de l'Institut national des Appellations d'Origine écrivait récemment : « Le certificat d'agrément n'est pas un « label » de qualité... Il constitue une règle dont l'application à un moment donné de l'évolution du vin ne préjuge en rien de son devenir qualitatif, lequel reste sous l'entière responsabilité de ceux qui en ont la charge ». Certaines régions ont instauré un contrôle gustatif précédant la mise en bouteilles. Ces différents contrôles ont beaucoup contribué à améliorer la qualité, certainement moins par un effet de sélection, que par le développement du progrès technique auquel ils incitent. Le producteur dans l'obligation de présenter très tôt un vin bien constitué et correctement élaboré a été amené à avoir recours à l'analyse et au conseil technique.

La loi du 1er août 1905 sur la loyauté des transactions commerciales, qui est à la base de la création du Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité, a posé le problème de la définition des produits. Une réglementation suppose en effet une définition précise de ce que l'on veut réglementer. Au fur et à mesure que progresse la connaissance du vin et des phénomènes complexes qui

entrent en jeu dans son élaboration, que les moyens d'obtention de la qualité sont mieux connus et mieux réalisés, se met en place une réglementation plus précise et plus stricte. Celle-ci est efficace dans la mesure où elle suit de près le développement des connaissances œnologiques et où elle s'accorde avec lui. La modification des techniques de vinification a imposé la modification de certaines normes de composition; par exemple les limites de l'extrait sec d'un vin rouge tiennent compte de l'importance de la macération en cours de vinification, représentée par un indice des composés phénoliques. Les taux limites d'anhydride sulfureux suivent maintenant le type de vin, et s'abaissent progressivement au fur et à mesure que sont mieux connues les propriétés de cet antiseptique et les lois de sa combinaison aux constituants des raisins et des vins. On pourrait multiplier les exemples de cet aspect technique réglementaire, notamment au sujet des traitements de clarification et de stabilisation.

En somme la réglementation définit et garantit une qualité minimale et est une incitation à améliorer ce seuil. C'est la technique œnologique qui en donne les moyens. D'où que l'on parte, on revient toujours au rôle prééminent de la technique; c'est elle qui a les clefs de la qualité.

Les caractères analytiques

Cordonnier (1977) a montré à ce sujet qu'il n'y avait actuellement aucun espoir de définir analytiquement la qualité d'un vin. La qualité c'est ce qui fait la différence entre le vin commun et le grand vin et on ne saurait exprimer cette différence par l'analyse, aussi détaillée soit-elle. La qualité n'est pas due à une certaine teneur en tel ou tel produit odorant ou sapide, mais à des équilibres complexes de constitution. On peut schématiser la structure du vin en le séparant en deux parties : des substances fixes représentant un support gustatif et des substances volatiles décelées à l'olfaction. La qualité d'un vin dépend de la richesse et de l'harmonie des constituants du « support » entre eux, de la richesse et de l'harmonie des substances odorantes entre elles, et de l'harmonie entre le « support » et la partie olfactive. Ces équilibres ne sont pas chiffrables. L'indice de souplesse (degré — acidité + composés phénoliques) est une tentative pour définir un certain équilibre des saveurs; il n'a qu'une valeur approximative.

Mais si l'analyse chimique n'est pas capable de quantifier une qualité, elle peut très bien mesurer un défaut et ainsi permettre de fixer des limites à certains constituants provenant des raisins (diglucoside malvoside), ou d'altérations bactériennes (acidité volatile, acétate d'éthyle) ou d'additions (acide citrique, anhydride sulfureux, sulfates, sodium) ou de souillures ou de pratiques frauduleuses (arsenic, dérivés cyanés, bore, brome, fluor, plomb, etc).

L'analyse peut encore rechercher des rapports entre constituants normaux ou entre certains indices (rapport alcool/extrait, taux des cendres et de leur alcalinité, etc.) Ils expriment certaines lois physiologiques de la constitution des raisins, mais dépendent des techniques de vinification, et des seuils de solubilité. Pour inclure tous les cas normaux, les limites doivent être calculées assez largement; elles ne décèlent que des cas anormaux extrêmes.

Les caractères organoleptiques

Puisais traite dans le cadre de ce Symposium des techniques de dégustation appliquées au contrôle organoleptique de la qualité; nous renvoyons donc à cette communication. Nous soulignons simplement ici la place de plus en plus importante

que prend l'expertise gustative aussi bien pour le contrôle de la qualité des vins d'appellation d'origine ou des vins de pays que pour apporter une preuve complémentaire en cas d'instruction judiciaire.

Les qualités hygiéniques

Bien que le choix alimentaire soit généralement davantage sous la dépendance des sens que de celle des besoins corporels, on ne saurait négliger les qualités nutritionnelles très réelles du vin. Ce sujet est traité par MASQUELIER dans le dernier rapport de ce Symposium. Les consommateurs sont très sensibles aux notions de pureté, de franchise, de naturel, d'authenticité, même s'il n'est pas exact que dans leur esprit et suivant une opinion peu réaliste, les qualités nutritionnelles et hygiéniques du vin, son innocuité pour l'organisme, passent avant ses qualités organoleptiques, Il faut d'abord que le vin soit bon, mais il ne suffit pas qu'il soit bon; il faut qu'il soit aussi hygiéniquement une bonne chose. BRUGIRARD (1976) rappelle que l'œnologue a pour devoir de veiller aux qualités hygiéniques du vin en supprimant ou en réduisant au strict minimum les additions et les interventions chimiques. Cela va tout-à-fait dans le sens actuel d'une saine œnologie. C'est ce que nous avons souvent traduit en donnant la priorité à l'œnologie préventive sur l'œnologie curative : vinifier de telle façon que le vin n'aura plus à subir qu'un simple traitement de clarification. Les moyens de ce programme sont : la propreté, l'asepsie pour réaliser une diminution des teneurs en anhydride sulfureux, la conservation des éléments aromatiques fragiles grâce à la protection des oxydations et la maîtrise des températures d'élaboration et de garde, les précautions pour éviter les souillures par des éléments étrangers, la limitation des traitements de clarification et de stabilisation appliqués au vin.

MESTRE et CABANIS (1977) le soulignent : « Les qualités hygiéniques ne sont pas seulement les propriétés nutritionnelles, ce sont aussi celles qui traduisent la valeur naturelle de cette boisson, sa pureté vis-à-vis des additifs (produits phytosanitaires, produits œnologiques, impuretés accidentelles ou frauduleuses ».

Le contrôle technique de la qualité

La dégustation n'est pas tout le contrôle technique de la qualité, mais elle en est un élément essentiel. L'analyse chimique y participe également et reste la base à la fois du contrôle technique et du contrôle réglementaire. Elle est capable de donner la constitution d'un vin en ses éléments essentiels, sous une forme objective et chiffrée, même si elle ne peut atteindre encore tous les constituants doués de saveur ou d'odeur, ni représenter les équilibres entre ces diverses perceptions.

Le contrôle de la qualité se développe à tous les niveaux, avec toujours plus de rigueur, qu'il s'agisse de la production ou encore de la commercialisation en bouteilles, et surtout pour l'exportation, en tenant compte des exigences toujours plus sévères des consommateurs étrangers. Il comporte aussi à ce stade des éléments de la présentation du produit : esthétique et résistance à l'usure de l'habillage (étiquettes, capsules), qualité du bouchon, efficacité du bouchage. Les essais de tenue qui consistent à placer le vin dans des conditions extrêmes (à des températures basses ou élevées, au contact de l'oxygène, à la lumière) permettent de

mesurer les risques de trouble et de dépôt. Le contrôle porte encore couramment sur des mesures plus rigoureuses de la limpidité : nombre de particules, nombre de cellules vivantes de levures et de bactéries qui ont échappé à la clarification, éventuellement identification de ces microorganismes. Ce contrôle de la tenue microbiologique oblige à des techniques de filtration de plus en plus efficaces et à des mesures d'asepsie du matériel d'embouteillage de plus en plus rigoureuses. Le contrôle de la qualité est un facteur de progrès, en ce sens qu'il incite à la recherche constante d'améliorations techniques.

Conclusions

Tous les aspects de la qualité sont du domaine propre de la connaissance du vin, c'est-à-dire de l'œnologie. Encore aujourd'hui la qualité des vins n'est pas toujours ce qu'elle pourrait être, parce que les possibilités de l'œnologie à cet égard sont insoupçonnées par certains et, dans les meilleures conditions, sont insuffisamment utilisées. Il y a encore trop de vins qui ne doivent rien aux principes de l'œnologie, qui faussent le goût des consommateurs et concurrencent ainsi la production des bons vins.

Selon la formule d'un dirigeant de la viticulture girondine : « La qualité est un état d'esprit, une volonté et un souci permanent de faire mieux ». Ce progrès passe nécessairement par la meilleure connaissance. L'argument peut se transposer aussi au consommateur ,dont l'éducation est à faire ou à parfaire. Si les bons vins affinent le goût des consommateurs, les consommateurs avertis contribuent par leur choix, à faire progresser la qualité des vins.

Il s'ajoute une mission de plus aux multiples fonctions de l'œnologie : celle de mieux faire connaître le vin pour mieux le faire apprécier.

Summary

The criteria of the quality of wine

The definition of the quality of a wine can only be relative because quality depends on the aptitude of the consumer to perceive and judge it. Many authors have similarly expounded the difficulty of defining and analysing the factors of quality. Natural conditions embody a potential; they have been chosen by man and it is he alone who seeks and acheives quality. Quality is also relative to the type of wine and its place in the hierarchy.

The criteria of quality have often been defined. Quality is firstly the absence of faults; organoleptic characteristics are always the most important since the wine is judged in the first instance by the pleasure fiven during its consumption. Chemical analysis is an effective support for tasting but could not replace it. Hygenic qualities are also involved; sound winemaking procedures avoid excessive spoilage treatments and permit reduced additions of indispensable additives.

Quality is guaranteed for the consumer by the various controls to which the wine is submitted between the time when winemaking begins and the time of bottling. Statutory controls ensure authenticity and a minimum level of quality from both the analysis for standard levels of components and organoleptic appreciation. The development of technical control of quality occurs increasingly in the firms which distribute bottled wine. In addition to component analysis and tasting, microbiological tests, stability tests and the quality of presentation are used as means of control.

We have tried to show, in this paper, that all aspects of quality are relevant to œnology.

Key-words: *Wines — Quality — Criteria — Control.*

Références bibliographiques

AMERINE M. A., ROESSLER E. B., 1976. *Wines. Their sensory evaluation*, W. H. Freeman and Co, San Francisco.

BOURZEIX M., 1976. Les composés phénoliques du raisin et du vin. Leurs effets sur la qualité, *Rev. Franc. Œnologie*, **63**, 53.

BRUGIRARD A., 1976. Tendance des traitements pour la présentation des vins de meilleures qualités hygiéniques et organoleptiques, *Rev. Franç. Œnologie*, **63**, 45.

CORDONNIER M., 1977. Information du consommateur sur la qualité organoleptique des vins par l'analyse, *Rev. Franç. Œnologie*, **64**, 57.

COSTE P., 1968. Essai de classification universelle et rationnelle des vins, *J. français des Appellations d'Origine*.

DEBRY G., 1976. La qualité de l'aliment, *Ind. alim. agric.*, **93**, 157.

LARREA A., 1956. Aspect technique du problème de la qualité. *VIIIe Congrès intern. Vigne et Vin*. Santiago du Chili, *Bull. O.I.V.*, 1959, **31** (343), 26.

LARREA A., 1976. Vinos y calidad. *La Semara vitivinicola*, 1049.

MESTRE R., CABANIS J. C., 1977. Information du consommateur sur la qualité hygiénique des vins par l'analyse, *Rev. Franç. Œnologie*, **64**, 65.

PARONETTO L., 1976. Tecnologia e qualita del vino, *L'enotecnico*, **12** (40), 13-17.

PISANI R., 1975. L'évolution de la qualité dans le domaine du vin en France, *Bull. O.I.V.*, **530**, 349.

POUPON P., 1975. *Nouvelles pensées d'un dégustateur*, Bibliothèque de la Confrérie des Chevaliers du Tastevin.

QUITTANSON C., 1976. *Connaissance et gloire du vin*, Ed. Brès, Paris. De la cuve à la table, le vin demeure de nos jours un produit de qualité, 159.

RIBÉREAU-GAYON J., 1974. Les facteurs humains de la qualité des vins, *Actes Acad. Nat. Sci. Belles-lettres et Arts de Bordeaux*, **29**, 64.

RIBÉREAU-GAYON J., 1975. Principes de la définition et de l'appréciation de la qualité des vins, *5es journées nat. de la Qualité*. Paris.

RIBÉREAU-GAYON J., 1975. Le caractère relatif de la notion de qualité des vins et ses conséquences, *C. R. Acad. Agric.*, **61**, 947.

RIBÉREAU-GAYON J., 1976. Mécanisation de la vendange et qualité des vins, *C. R. Acad. Agric.*, **62**, 573.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1975. *Sciences et techniques du vin, Traité d'œnologie*, Tome 2. Dunod, Paris, p. 5.

RIBÉREAU-GAYON J., RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Évolution des concepts et techniques de la qualité des vins, *6es Journées nat. de la Qualité*, Paris.

ROUBERT J., 1976. Tendance de la vinification pour l'obtention de vins de meilleures qualités hygiéniques et organoleptiques, *Rev. Franç. Œnologie*, **63**, 39.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 349-350

INTERVENTION

Évolution des taux d'acidité volatile depuis le début du siècle

P. SUDRAUD

Station agronomique et œnologique
Université de Bordeaux II (France)

L'acidité volatile a toujours été et reste un des éléments importants de l'appréciation de la qualité d'un vin. En effet, cette acidité volatile fut un des premiers critères servant d'une part à caractériser une maladie du vin et d'autre part, à le considérer comme impropre à la consommation. L'évolution des taux d'acidité volatile depuis la fin du siècle dernier ou le début du siècle actuel est assez intéressante à signaler.

Évolution de la limite légale

Dans le tableau ci-joint, nous avons fait figurer les valeurs de la limite maximum de l'acidité volatile des vins propres à la consommation selon la réglementation française et en dernier lieu la réglementation communautaire. Il est un peu étonnant de constater qu'en quarante ans (entre 1921 et 1962) cette limite soit pas-

TABLEAU

Limite maximum de l'acidité volatile des vins propres à la consommation
(exprimé en g/l d'H_2SO_4)

Décret du 19 août 1921	Acescence simple	2,50
	Caractères organoleptiques de vins piqués	2,00
Décret du 1er février 1930	Acescence simple	1,80
	Caractères organoleptiques de vins piqués	1,50
Décret du 23 juin 1938	Production négoce	1,20
	Détail	1,50
Décret du 30 septembre 1953	Production négoce	1,10
	Détail	1,20
Décrets du 21 juillet 1962 et 23 novembre 1967	Production négoce	0,90
	Détail	1,00
Projet réglementation communautaire 1977	Vins blancs	0,88
	Vins rouges	0,98

sée de 2,50 g/l à 0,90 g/l. Par contre, il semble que l'on arrive actuellement à un palier, car dans les quinze dernières années (1962 à 1977) il n'y a pas de modification sensible de la valeur limite.

Il faut enfin signaler que dans de nombreux pays, il existe des valeurs limites plus faibles pour certains vins et il est bien évident que les limites figurant dans le tableau ne correspondent qu'à une qualité minimum au-dessous de laquelle le vin est jugé impropre à la consommation et que de tels chiffres sont souvent jugés élevés par la plupart des œnologues pour la grande majorité des vins à l'exclusion bien entendu, de certains vins spéciaux.

Évolution des taux moyens

A la fin du siècle dernier les acidités volatiles relevées dans le Traité d'Analyse des vins de GAUTHIER et dans la mise au point du dosage de l'acidité volatile selon la technique DUCLAUX-GAYON sont le plus souvent élevées et dépassent fréquemment 1 g/l et dans le dernier ouvrage il est étonnant de constater que des vins considérés comme sains, possèdent des acidités volatiles allant de 0,53 à 0,92 g/l. L'auteur précise cependant que « la proportion (d'acidité volatile) ne doit pas dépasser sensiblement 1 g/l ». De même des analyses effectuées au début du siècle, par la Station Agronomique et Oenologique de Bordeaux, donne des chiffres allant de 0,18 à 1,15 g/l, des chiffres inférieurs à 0,50 g/l ne représentent que 20 p. 100 de l'ensemble. De même les analyses de 41 millésimes d'un cru du Médoc (de 1806 à 1919) indiquent des valeurs souvent élevées de l'acidité volatile dont près de la moitié dépassent 1 g/l. Dans sa thèse, PEYNAUD analysant des vins du premier tiers du XXe siècle, signale des valeurs d'acidité volatile souvent très élevées avec une valeur moyenne de 0,83 g/l. Or, il s'agissait de grands crus du bordelais dont la qualité était certaine; J. RIBÉREAU-GAYON écrivait qu'il était inexact d'affirmer « qu'un vin dont l'acidité volatile dépasse 0,70 à 0,80 g/l est un vin en voie d'altération ».

Il n'y a donc qu'une trentaine d'années que les valeurs moyennes de l'acidité volatile ont sensiblement diminué dans les vins, grâce à l'amélioration des techniques de vinification et de conservation.

En ce qui concerne plus particulièrement les vins rouges, il est curieux de constater l'évolution de la notion de qualité des grands crus du Bordelais. En effet, il est à peu près sûr que certains vins considérés comme techniquement bien élaborés et présentant une qualité remarquable, il y a seulement cinquante ans, nous apparaîtraient aujourd'hui comme possédant quelques défauts tant du point de vue organoleptique qu'analytique.

Conclusions

Ces quelques rappels des taux d'acidité volatile que l'on rencontrait dans les vins, il y a à peine cinquante ans, associés aux limites légales de 1921 à nos jours montrent bien une évolution très sensible de cet élément très important de la qualité des vins, évolution due à la fois à l'amélioration des techniques d'élaboration, de conservation et de contrôle et à une meilleure connaissance et appréciation organoleptique du produit.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 351-366

Le contrôle organoleptique de la qualité : techniques de dégustation

J. PUISAIS

Laboratoire départemental et régional d'Analyses et de Recherches de Tours (France)

Résumé

L'analyse sensorielle apparaît comme une technique complémentaire indispensable à l'appréciation de tous les éléments qui interviennent dans notre alimentation. Comme toute technique d'analyse, elle doit être parfaitement définie afin de s'écarter de tout caractère subjectif. Le contrôle de la qualité organoleptique des vins s'appuiera donc d'une part sur la formation de goûteurs et d'autre part sur la description détaillée des conditions de l'examen sensoriel.

La formation de goûteurs apparaît indispensable et urgente. Elle doit être basée sur les aspects de physiologie sensorielle de façon à préciser l'ensemble des stimulations perçues et les facteurs de variations internes et externes pouvant modifier les performances du goûteur. Les conditions de l'apprentissage et leur fréquence sont des éléments essentiels pour maintenir les appareils de mesure en parfaite condition.

Au niveau de l'organisation de la dégustation, l'atelier sensoriel et la salle de dégustation doivent correspondre à des normes précises concernant la nature des matériaux, les dimensions et l'équipement. La programmation des examens sensoriels doit être faite par des spécialistes qui ne devront poser aux goûteurs que des questions auxquelles ils sont susceptibles de répondre compte tenu de leur niveau de mémorisation. Cette programmation entraînera l'établissement de fiches parfaitement adaptées au type de l'analyse sensorielle qui peut être à caractère technique, écologique, économique.

Mots clés : *Vins — Analyse sensorielle — Formation des goûteurs — Dégustation — Programmation.*

Introduction

En 1964, lorsque le Pr TERROINE organisa un colloque sur l'appréciation des caractères organoleptiques des denrées alimentaires, bien des participants ont mesuré l'importance de telles journées. Elles ont marqué une nouvelle étape montrant qu'il était urgent de doter cette technique d'une méthodologie précise.

On ne doit plus entendre dire que les impressions sensorielles sont subjectives car ceci serait au détriment de la qualification des produits entrant dans notre alimentation.

Le but de cette note sera donc d'aborder les techniques d'analyses sensorielles,

ou dégustation, compte tenu des connaissances actuelles en matière de physiologie sensorielle, d'organisation de la dégustation, de connaissances œnologiques de façon à bien montrer que ce qui est subjectif pour certains n'est simplement qu'ignorance ou mauvaise interprétation des résultats de ces examens.

Nous savons que le but final du vin est d'entrer dans notre alimentation; or, la qualité d'un aliment quel qu'il soit doit répondre à deux impératifs :

— une sécurité alimentaire dans le cadre de la barrière-santé,

— un plaisir sensoriel correspondant à des habitudes alimentaires et à des facteurs personnels.

Telle se présente la qualité des aliments. On s'aperçoit alors que l'analyse sensorielle doit compléter les déterminations analytiques rendues possibles au fur et à mesure du développement de l'analyse chimique ou physique et qu'elle demeure un élément prépondérant.

Cet aspect est tellement important que le Commissariat au VIe Plan avait abordé le problème des caractères organoleptiques des aliments de la façon suivante : « il est hors de doute que ce type de qualité concerne le nutritionniste comme le producteur d'aliment, et cela va de soi, le consommateur. En effet, si l'innocuité des aliments est une condition primordiale et absolue, il est clair que les sensations provoquées par les aliments ont des répercussions physiologiques et psychologiques importantes qui sont à la base du comportement alimentaire du consommateur et ont de ce fait un impact économique considérable. La libido de l'alimentation doit être semble t-il satisfaite; c'est probablement un facteur d'équilibre des individus et des sociétés. La gastronomie est un élément de l'art de vivre, elle doit être préservée. L'idée selon laquelle les générations futures se nourriront de pilules ou d'aliments insipides est à la fois fausse et néfaste ».

En matière de vin, comme pour la plupart de nos aliments, on peut avancer que l'analyse sensorielle a permis de sélectionner un certain sens de la qualité au travers de différentes régions. On sait par exemple que des vignobles anciens ont affiné le choix des cépages, les techniques de vinification, l'élevage du vin, uniquement à partir de mesures sensorielles.

En effet, les déterminations physiques et chimiques sont relativement récentes et si elles ont permis de faire de grands progrès en particulier vis-à-vis des substances échappant à l'aspect sensoriel, elles ont parfois fait dévier la conception de la production. Sur le plan œnologique, chacun à l'heure actuelle mesure l'erreur d'avoir voulu donner la valeur du vin uniquement en fonction de son degré alcoolique.

C'est donc dire que l'analyse sensorielle ne doit pas être controversée. Par contre, tout doit être fait pour qu'elle devienne une méthode stricte.

Les modes de la dégustation se définissent par le but recherché. Le fait que l'on ne connaisse pas quel va être l'objectif précis de l'analyse sensorielle fait que celle-ci est mal programmée. Dans ce cas-là, il est donc normal que les réponses ne soient pas en harmonie avec le but recherché. Nous considérons qu'il y a deux grandes catégories de dégustations : l'une à caractère technologique permettant de connaître l'équilibre du vin au travers des différentes stimulations perçues et la seconde à caractère écologique permet de comprendre le style du vin compte tenu de son origine. C'est certainement cette deuxième partie qui est la plus difficile à effectuer car elle exige des goûteurs ayant un haut niveau de mémorisation.

Ces deux grandes dégustations font que la première a pour but d'examiner des vins dans la complémentarité d'une analyse œnologique. Elle sera exécutée par un Oenologue. Il devra s'assurer que les caractères organoleptiques sont en harmonie avec la composition du vin. La seconde, par contre, peut être effectuée

par des Oenologues ou des spécialistes en matière d'examen sensoriel des vins attachés à des micro-productions et ayant ainsi une connaissance plus approfondie des terroirs.

En vue de ces dégustations, on précisera l'état-civil du vin, c'est-à-dire la présentation sous laquelle il va être offert au juge, au consommateur, à l'acheteur. Cette présentation, qui doit correspondre à l'étiquette, peut intéresser les types de vins suivants :

— *Vin anonyme.* Il provient d'un assemblage lié à des habitudes alimentaires, suivant les lieux de production, de consommation, parfois les saisons.

— *Vin de cépage.* C'est l'expression du cépage qui est recherchée.

— *Vin d'origine de grande région.* C'est le climat de cette vaste zone de production qui imprime les principaux caractères au vin.

— *Vin d'origine de terroir.* Vins de crus correspondant à l'expression d'un micro-climat.

L'homme en tant qu'appareil de mesure, jouera un rôle prédominant dans l'analyse sensorielle et l'organisation de la dégustation devra préciser l'environnement du goûteur de façon à mieux maîtriser les performances sensorielles. Il sera aidé dans cette tâche par les fiches de dégustation et un vocabulaire imposé.

L'homme appareil de mesure

Il est indispensable que chaque goûteur connaisse les différentes stimulations qu'il va ressentir pendant la dégustation.

Les stimulations

— Stimulations intervenant avant l'ingestion.

Stimulation visuelle

Elle renseigne sur les différents états du vin, la limpidité, la couleur et sa nuance.

Stimulation olfactive

C'est là une stimulation très fine. Elle permet la perception des substances volatiles à des degrés de performance nettement supérieurs à ceux des méthodes d'analyses les plus modernes.

— Stimulations intervenant lorsque le vin est au contact de la paroi buccale.

Stimulation gustative

Ces stimulations doivent être en harmonie si l'on ne veut pas avoir de dominante acide, sucrée, salée ou amère. Elles sont perçues au contact des récepteurs ou des papilles gustatives placés sur la langue.

Stimulation olfactive

Si l'on appelle odeur l'ensemble des corps responsables des stimulations olfactives en flairant directement le vin, lorsque cette perception se fait par voie rétronasale, on emploie la terminologie arôme.

Stimulation mécanique

En matière de vin, c'est surtout l'aspect tactile qui sera retenu. On oublie d'ailleurs trop souvent le caractère colloïdal du vin qui est apprécié par cette stimulation.

Cette stimulation sera donc perçue par l'ensemble de la paroi buccale puisqu'elle se rapproche du sens du toucher.

Stimulation thermique

Cet aspect est primordial. Il se rattache au sens du toucher.

Stimulation chimique

Elle nous renseigne sur des impressions comme le brûlant, l'astringent, le piquant et des stimulations métalliques. Cette stimulation chimique est perçue par les extrémités libres des trijumeaux qui sont localisés dans la paroi buccale.

Enfin, en bouche, une notion de persistance de ces différentes stimulations intervient. L'étalon est la codalie (une seconde de persistance).

Voici donc décrites les principales stimulations qui interviennent lors des dégustations et leurs centres de réception.

Toutes ces stimulations sont intégrées par le système nerveux central et sont à la base de notre comportement.

Facteurs internes de différenciation

Les stimulations sensorielles alimentaires qui donnent lieu à une certaine mémorisation peuvent être interprétées d'une façon différente d'un individu à l'autre. En effet, l'individu sera influencé par des facteurs du dehors comme les mœurs, les coutumes, les habitudes alimentaires, les groupes ethniques.

Il y aura également des facteurs interoceptifs qui correspondront à des régulations physiologiques, neurologiques et biochimiques, propres à l'individu. Parmi les facteurs physiologiques, on se trouve devant les facteurs extéroceptifs c'est-à-dire qui donnent une discrimination qualitative et intéroceptifs où la discrimination est quantitative.

Ces connaissances sont nécessaires afin de pouvoir mieux établir un état-civil du goûteur et ainsi mieux comprendre les limites et les performances de cet « appareil de mesure ».

L'apprentissage

En toutes choses, l'apprentissage a un rôle important. Il faut que le goûteur puisse décoder l'ensemble des impressions qui sont perçues dans son cerveau.

Régulièrement, sa mémoire sera exercée à partir de stimulations de référence.

Les facteurs influençant les mesures

Bien des gens considèrent que l'analyse sensorielle est subjective. Nous pensons que ce qui paraît subjectif parfois correspond bien souvent à un manque de connaissance des facteurs extérieurs intervenant au niveau des performances de l'appareil de mesure, c'est-à-dire du goûteur.

Influence thermique

Cet aspect tient compte de la température du liquide. Il est donc indispensable, au cours de la dégustation, de connaître celle-ci exactement. La stimulation de certains composants est liée à la température.

La température d'un vin en bouteille passe de 7° à 9° en un quart d'heure dans un local à 25°. Au bout d'une heure, la température est voisine de 13°.

Lorsque l'on verse du vin dans un verre, il passe de 8° à 11° en un quart d'heure et à 13° en une demi-heure, ceci pour un local à 25°.

Température des locaux : on sait qu'un goûteur n'aura pas des performances identiques s'il se trouve dans un local chaud ou froid. Cette température se situera aux environs de 18°, elle sera en relation avec l'hygrométrie.

Influence de l'hygrométrie

Les impressions olfactives des aliments et des boissons sont liées à la libération de substances volatiles qui, par voie directe, sont perçues au niveau du bulbe olfactif.

Il faut donc rechercher une hygrométrie optimale pour la dégustation en relation avec la température. Par exemple, à 25°, on se situera à 40 p. 100 d'humidité alors qu'à 15°, elle approche 80 p. 100.

Ce sont là des tendances qu'il faut respecter car si l'on s'en éloigne les performances seront atténuées. Considérons que 60 p. 100 d'humidité et 18° représentent des valeurs optimales.

Influence des bruits

Deux cas sont à envisager :

— Les locaux. — Il est facile de mesurer le fond sonore d'une pièce en utilisant un sonomètre. A ce niveau intervient donc le problème d'isolation des locaux.

— Les personnes. — En matière de dégustation, il n'est pas possible de laisser parler les membres d'un jury quel qu'en soit leur nombre. Par contre, il est tout à fait possible qu'il y ait une présentation des vins avant la dégustation ou en cours de dégustation pour situer certains aspects techniques ou technologiques nécessaires à mieux programmer la dégustation.

D'une façon générale, on peut dire que le bruit diminuera les performances sensorielles et les impressions de persistance.

Influence visuelle

Cet aspect touche l'ensemble des stimulations visuelles qui peuvent conditionner l'appareil de mesure. C'est un sujet très vaste et il faut tenir compte non seulement des couleurs mais de la luminosité, des mouvements en envisageant également la nature des matériaux et leur aspect plus ou moins lisse, alvéolé ou brillant.

Le bois, la pierre sont bien adaptés aux performances de l'appareil de mesure. Les tendances ci-après sont enregistrées :

— le vert (n° 379 du Code de SEGUY) renforce l'acide,
— le jaune (n° 244 du Code de SEGUY) renforce le salé,
— le bleu (n° 469 du Code de SEGUY) renforce l'amer,
— le rouge pourpre (n° 33 du Code de SEGUY) renforce les impressions positives et atténue les négatives.

La luminosité représente un point non négligeable. On peut par exemple choisir 300 lux.

Dans ce domaine, interviennent également les sources d'éclairage et les tubes fluorescents — même s'ils sont protégés par des filtres — donnent de moins bons résultats que les lampes à filaments incandescents.

Influence de la turbulence

Pendant la dégustation, aucun courant d'air ne doit être enregistré. Cette notion va même jusqu'à trouver très insupportable un mouvement autour de soi.

Influence des odeurs

En tant qu'odeurs, on entend les substances volatiles, voire les particules qui sont dans l'atmosphère du local où la dégustation est pratiquée.

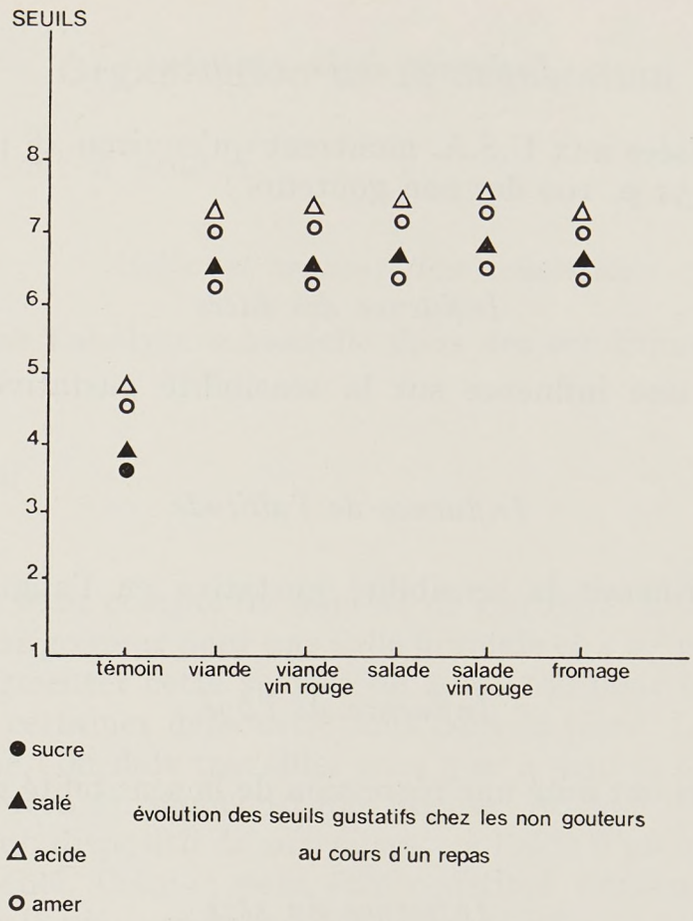
Il est nécessaire que des sujets ne participant pas à la dégustation et se trouvant à l'extérieur dans une zone parfaitement ventilée, pénètrent régulièrement dans la salle pour vérifier qu'il n'y a pas d'odeurs nouvelles. On peut faciliter ce contrôle de l'odeur en travaillant avec un olfactomètre en prise directe sur la pièce et, suivant le débit d'air pompé, il est possible d'apprécier l'odeur de fond et prévenir toute modification.

Influence des aliments

L'alimentation peut modifier les perceptions gustatives. Les modifications observées dépendent du changement de composition de la salive.

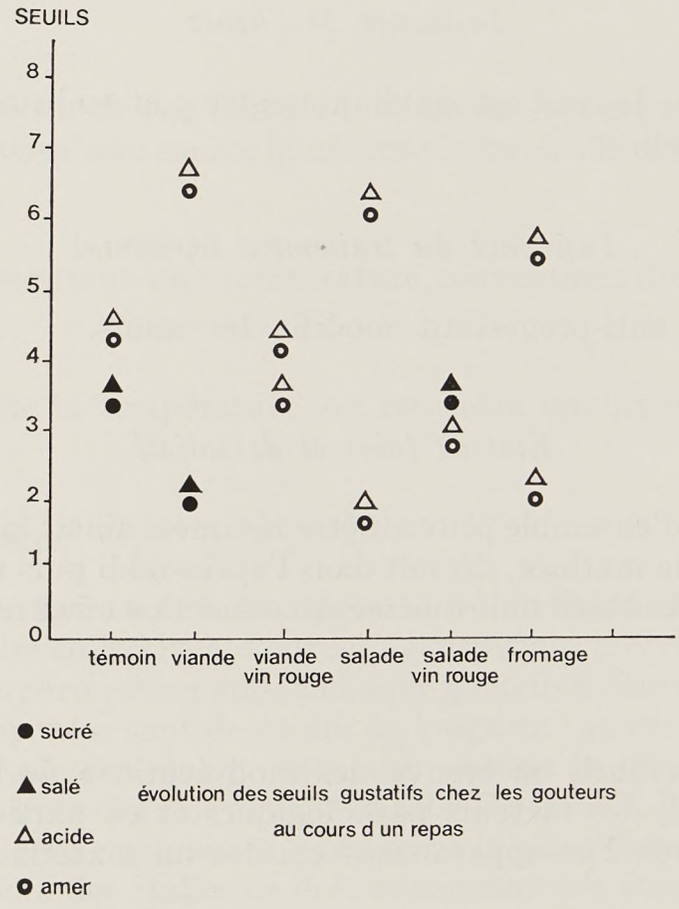
En effet, la salive s'adapte au type d'aliment de manière à ce que le milieu buccal possède toujours un pH voisin de la neutralité. Cette auto-régulation nerveuse se fait par l'intermédiaire des systèmes tampons salivaires, bicarbonate et phosphate.

Au cours d'un repas, constitué de viande, de salade et de fromage, ROUGEREAU (ROUGEREAU, 1974, 1975; ROUGEREAU et BERENHOLC, 1969; ROUGEREAU *et al.*, 1973, 1975) a constaté que la population d'individus testés était partagée en deux groupes : le groupe des goûteurs génétiques et celui des goûteurs non génétiques (fig. 1 et 2).



évolution des seuils gustatifs chez les non gouteurs au cours d'un repas

FIG. 1.



évolution des seuils gustatifs chez les gouteurs au cours d un repas

FIG. 2.

Influence de la génétique

Les études réalisées aux U.S.A. montrent qu'environ 48 p. 100 sont des goûteurs génétiques et 52 p. 100 des non goûteurs :

Influence des races

Elles auraient une influence sur la sensibilité gustative.

Influence de l'altitude

L'altitude modifierait la sensibilité gustative en l'augmentant.

Influence de l'âge

Tous les auteurs ont noté une régression de la sensibilité gustative avec l'âge.

Influence du sexe

Les hormones sexuelles mâles ou femelles semblent intervenir au niveau gustatif.

Influence de l'heure

On remarque que le seuil est maximum entre 9 et 10 heures le matin et 15 et 17 heures l'après-midi.

Influence du traitement hormonal

Un traitement anti-progestatif modifie les seuils.

État de faim et de satiété

Les conclusions d'ensemble peuvent être résumées ainsi : la sensibilité gustative est augmentée dans la matinée, décroît dans l'après-midi puis remonte à 16 heures. Les seuils ne sont pas basés uniformément comme à 11 heures.

Autres facteurs

Au niveau individuel, on trouve des modifications de sensibilité gustative par le tabac, l'alcool, des facteurs pathologiques et en particulier par la qualité de prothèses dentaires, l'or apparaissant comme un matériau neutre.

Organisation de la dégustation

Trois points sont à étudier :

Atelier et organisation sensoriels

Il faut exécuter l'analyse sensorielle dans des conditions identiques ou tout au moins définies.

Description du local

Dimensions :

Le local devra tenir compte du nombre de goûteurs. Il faut compter au minimum 2 m² au sol par goûteur pour une salle normale et 4 m² pour un atelier de bon niveau. Il faut augmenter cette surface de 20 p. 100 pour faciliter la circulation et éventuellement certaines démonstrations dans la pièce. Le volume de la pièce tiendra compte que l'on doit travailler sous 3 m à 3,50 m de plafond. Le renouvellement d'air se fera au moins 10 fois l'heure. Aucune odeur de fond ne doit être enregistrée et un dispositif de surveillance à l'aide d'un olfactomètre extérieur est vivement conseillé. Celui-ci peut être constitué simplement d'un aspirateur en prise directe sur la pièce avec possibilité de modifier le débit d'air. L'opérateur contrôle la qualité de l'air extrait à l'aide d'un masque. Les matériaux composant le cadre permettront d'adsorber les bruits de façon à ce que règne le silence. La décoration du local sera en matériaux non agressifs et sécurisants. On peut envisager la possibilité de modifier les couleurs du décor afin d'en apprécier l'influence.

Éclairage :

Celui-ci sera voisin de 300 lux. La lumière du jour est recommandée. Lorsque des stalles sont prévues, une source lumineuse individuelle et indirecte est nécessaire.

Température :

$20^0 \pm 1^0$ représentent une température conventionnelle.

Hygrométrie :

Compte tenu de la température, on retiendra une hygrométrie de 65 p. 100 ± 5 p. 100.

Aménagement du local

On peut avoir affaire soit à des dégustations individuelles, soit à des dégustations collégiales voire collectives. Pour les dégustations individuelles, il est conseillé d'utiliser des stalles permettant ainsi à chaque goûteur d'être séparé. Les dimensions habituellement proposées sont de 90 cm de longueur, 40 cm de profondeur, 75 cm de hauteur. Un léger évasement circulaire comme le propose RANKINE (1974) permet au goûteur d'être à l'aise devant sa table de travail. De même, la disposition des stalles en demi-cercle augmente légèrement la place disponible pour le goûteur. A notre avis, ce choix des stalles ne doit néanmoins pas être exagéré, le sujet pouvant souffrir d'une impression d'isolement. Pour les dégustations collégiales qui

nécessitent la présence d'un animateur par table, nous conseillons la table circulaire qui permet les échanges. Un diamètre de 1,25 m pour 6 personnes est suffisant (un espace de 2,50 m doit être maintenu entre les tables).

Les tables doivent pouvoir se nettoyer facilement. Les matériaux modernes offrent à ce sujet une vaste gamme. Pour les tables rondes, nous conseillons les matériaux stratifiés mat imitant le bois clair : merisier, noyer. Pour les tables individuelles, nous recommandons le ton «pierre» stratifié mat (nuance proche du violet 680 du Code Universel des Couleurs de SEGUY). On peut être amené pour des cas particuliers à recouvrir la surface des tables de panneaux de différentes couleurs.

Concernant ces exercices, il ne faudra jamais oublier que le goûteur ne doit pas être gêné. En effet, il aura à examiner souvent plusieurs vins, en particulier dans le cadre de dégustations triangulaires (dans certains cas, on lui présentera jusqu'à 9 échantillons) et il devra également porter des observations écrites sur la fiche de dégustation. Les sièges devront être confortables, sans accoudoir, munis de pastilles anti-bruit. Ils seront recouverts de matériau aéré (tissu, paille).

Pour la préparation des échantillons, il est préférable d'avoir une petite salle séparée où seront rassemblés les éléments permettant de maintenir les vins aux températures de service retenues.

Un hygromètre et un thermomètre seront prévus dans la salle.

En matière de dégustation de vin, il est usuel, pour éviter l'absorption d'une trop grande quantité de liquide, de rejeter le vin après qu'il ait été porté dans la paroi buccale. Des crachoirs sont donc prévus. Il faut absolument écarter les crachoirs blancs qui sont vraiment agressifs à l'œil.

Pour supprimer la fatigue du sens olfactif, on peut prévoir des arrivées d'air pulsé frais et humidifié pour chaque goûteur qui, à l'aide de masque, peut ainsi accélérer l'élimination de substances volatiles imprégnées dans ses fosses nasales.

Les verres

En matière de dégustation de vins, le verre est un ustensile important. Quel qu'il soit, sa préparation devra être soignée. Il faudra faire attention au rangement des verres et s'assurer qu'aucune odeur étrangère ne les imprègne.

La forme des verres

Depuis longtemps, la forme des verres était disparate. CHAUVET a démontré qu'il y avait une relation entre le rapport de la surface et le volume du liquide. Des études ont été ensuite menées par l'AFNOR et elles ont conduit aux verres normalisés bien connus qui ont fait l'objet de la norme AFNOR NF V 09 110 (1971).

En vue de la préparation des dégustations, il faut repérer d'une façon très lisible les verres soit à l'aide de plateaux munis de cercles correspondant à l'empreinte du verre et numérotés, soit directement en marquant le pied du verre.

Programmation de la dégustation

Si, autrefois, on se contentait de traduire les caractères organoleptiques d'une façon succincte, aujourd'hui, on utilise des fiches détaillées. Cette fiche de dégustation doit être préparée avec soin car elle correspond à une véritable programmation, c'est-à-dire que le responsable de la dégustation l'établit en fonction des résultats qu'il attend de l'analyse sensorielle.

Les fiches de dégustation

Après l'analyse de fiches, l'on retrouve de nombreux points communs. On peut considérer que leur programmation devrait porter les mentions suivantes aussi bien pour des analyses sensorielles à caractère œnologique qu'écologique : 1) la date et l'heure de la dégustation; 2) la température du local; 3) l'hygrométrie du local; 4) la catégorie du vin; 5) les principaux caractères analytiques du vin; 6) les stimulations intervenant avant la dégustation proprement dite en séparant les stimulations visuelles et olfactives; 7) l'ensemble des stimulations lorsque le vin est au contact des parois buccales et comprenant les stimulations olfactives, gustatives, chimiques, mécaniques, thermiques, 8) la typicité; 9) l'impression d'attaque du vin; 10) l'impression générale du vin; 11) la sensation de persistance olfacto-gustative.

Dans le cadre d'examens simples, la programmation devra exclure les points 5, 7 voire 9. Vis-à-vis de ces stimulations, il y aura lieu de répondre sous une forme quantitative et qualitative, c'est-à-dire en utilisant des échelles ordinales et hédoniques.

Ceci représente un schéma général qui, suivant le but recherché, peut être simplifié.

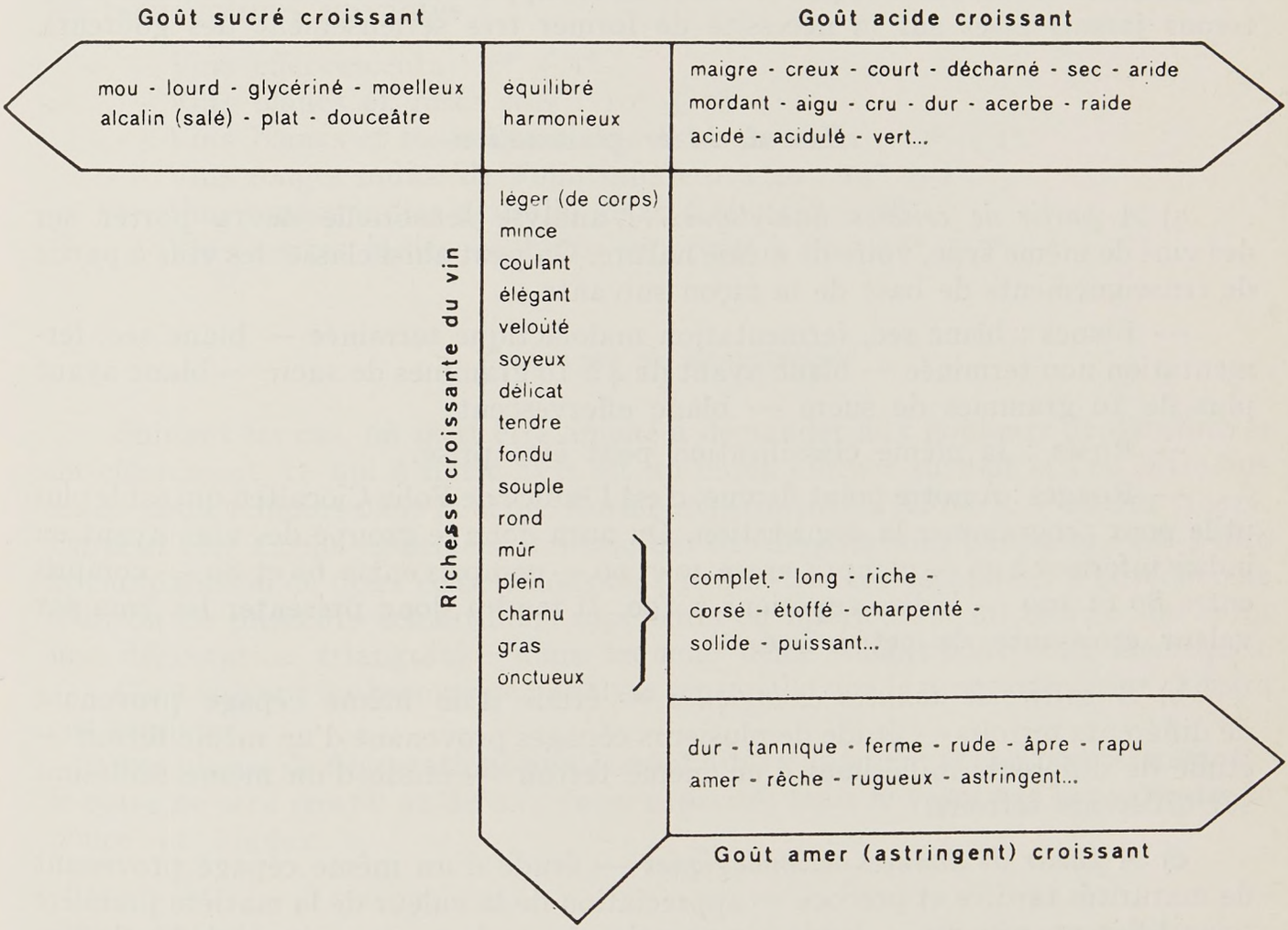


FIG. 3. — *Essai de figuration rationnelle d'un vocabulaire gustatif fondé sur l'équilibre : goût sucré ⇄ goût acide + goût amer* (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1975).

Termes basés sur l'influence gustative de la richesse du vin rouge en éléments constitutifs.

Vocabulaire

La programmation de l'analyse devra être en rapport avec le niveau de mémorisation des goûteurs et surtout leurs connaissances en matière de vin, soit dans le domaine technologique soit dans le domaine économique ou celui de la production. Pour aider au choix de termes, il faut citer l'essai de figuration rationnelle de RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1975) (fig. 3).

Schéma de dégustation

S'il est possible d'envisager une fiche de dégustation à caractère technique, tenant compte de l'ensemble des stimulations et représentant une véritable analyse sensorielle, s'il est possible d'envisager une fiche à caractère plus restreint pour des classements de vin provenant de zones de production ou de millésimes définis, d'autres cas peuvent se présenter. C'est alors que seules des stimulations partielles seront réclamées.

Devant l'importance prise par l'analyse sensorielle, l'on mesure celle de l'homme qui aura pour mission de programmer cette opération tout en connaissant parfaitement les niveaux de performance de ces appareils de mesure et nous n'insisterons jamais assez sur la nécessité de former très sérieusement des goûteurs.

Base de la programmation

a) *A partir de critères analytiques.* L'analyse sensorielle devra porter sur des vins de même type, voire de même nature. On peut ainsi classer les vins à partir de renseignements de base de la façon suivante :

— Blancs : blanc sec, fermentation malolactique terminée — blanc sec, fermentation non terminée — blanc ayant de 4 à 10 grammes de sucre — blanc ayant plus de 10 grammes de sucre — blanc effervescent.

— Rosés : la même classification peut être prise.

— Rouges : A notre point de vue, c'est l'indice de Folin Ciocalteu qui est le plus utile pour programmer la dégustation. On aura donc le groupe des vins ayant un indice inférieur à 40 — compris entre 40 et 60 — compris entre 60 et 80 — compris entre 80 et 100 — indice supérieur à 100. Il faudra donc présenter les vins par valeur croissante de cet indice.

b) *A partir de données écologiques* — étude d'un même cépage provenant de différents terroirs — étude de plusieurs cépages provenant d'un même terroir — étude de différents millésimes d'un même terroir — étude d'un même millésime sur différents terroirs.

c) *A partir de données technologiques* — étude d'un même cépage provenant de maturités tardive et précoce — appréciation de la valeur de la matière première pour différents cépages — étude comparative de rendements — étude de l'influence des pratiques pré-fermentaires.

d) *A partir de problèmes économiques* — relation entre les vins et les habitudes

alimentaires dues à une couche de la société — préférence de types de vin en fonction d'activités professionnelles.

Au niveau des stimulations en bouche, il faudra particulièrement insister sur la typicité, l'ensemble olfacto-gustatif et l'absence de défauts pouvant être liés aux caractères de l'année (par exemple : action du *Botrytis*, caractère de verdeur lié à une maturité tardive, etc.). Le jury sera choisi parmi des goûteurs connaissant parfaitement les conditions d'élaboration et de production de ce vin.

Mise en condition des goûteurs

Les dégustations dureront 1/2 h à 1 h et devront se dérouler 1 h à 1 h 1/2 avant les repas. 4 à 6 vins dans le type soumis à l'analyse seront d'abord proposés pour préparer les goûteurs.

Un nombre de 10 échantillons pourra être ensuite soumis. Ce chiffre peut être abaissé à 5 devant des dégustations à caractère très technique et porté parfois à 20 pour des classements simples.

Température de service des vins

Celle-ci est primordiale et nécessite des enceintes climatisées. On peut admettre les températures suivantes :

— Vins effervescents : $8^0 \pm 1^0$.
— Vins blancs et rosés secs : $10^0 \pm 1^0$.
— Vins blancs et rosés ayant des restes de sucre : $12^0 \pm 1^0$.
— Vins rouges indice de Folin inférieur à 40 : $14^0 \pm 1^0$.
— Vins rouges indice de Folin de 40 à 60 : $16^0 \pm 1^0$.
— Vins rouges indice de Folin supérieur à 60 : $18^0 \pm 1^0$.

Technique de dégustation

Suivant les cas, on peut être amené à demander aux goûteurs de déterminer un classement, ce qui à notre avis est un choix efficace surtout si l'on introduit un ou deux témoins dans la série. Norme expérimentale AFNOR V 09 012 (1972). On peut être amené également à demander des dégustations par paire c'est-à-dire la comparaison de deux échantillons ou par duo-trio correspondant à la recherche d'un ou de plusieurs échantillons supérieurs ou inférieurs à un témoin, ou enfin une dégustation triangulaire dans laquelle deux échantillons sont identiques.

C'est suivant les besoins de l'analyse sensorielle que le programmateur choisira ces formules.

Les phases de dégustations proprement dites s'appuient sur les points suivants : le verre ne sera rempli qu'au 1/4 de sa capacité; tenir le verre par le pied entre le pouce et l'index :

Phase visuelle

Elle se décompose en plusieurs opérations : examen du disque qui est formé par le ménisque du liquide, ce geste est particulièrement important pour l'examen

des vins blancs. Il sera fait en levant le verre suffisamment pour regarder la partie inférieure du ménisque — examen de la limpidité — examen de la couleur — examen des jambes du vin qui s'effectue après avoir fait lécher à trois reprises les parois du verre par le vin.

Phase olfactive

Premier coup de nez sans remuer le vin. On expire l'air de ses poumons et aussitôt après on flaire en inspirant l'air rassemblé au-dessus du vin. — Deuxième coup de nez après avoir imprimé un mouvement giratoire au vin permettant de dégager toutes ses odeurs, on flaire à nouveau. — Un troisième coup de nez peut être effectué en brisant le vin par des vagues provoquées à sa surface.

Phase gustative

Celle-ci consiste à porter en bouche un certain volume de vin. 8 $cm^3 \pm 2$ sont conseillés. Ce qu'il faut, c'est qu'un goûteur porte toujours en bouche un volume le plus régulier possible. Le vin est ensuite envoyé doucement dans le fond de la gorge mais, au moment où l'on a l'impression de l'avaler, on penche légèrement la tête de façon à obliger le vin à revenir vers la bouche. C'est à cet instant que l'on réalise une légère insufflation d'air qui évite au vin de sortir, qui le divise par voie « pneumatique », et qui favorise les stimulations olfactives des arômes.

On crache ensuite le vin (ce n'est d'ailleurs pas là une obligation lorsque le nombre d'échantillons est restreint). On répond alors chronologiquement suivant les stimulations perçues.

Conclusions

Si l'analyse chimique permet de connaître la composition du vin et en particulier celle d'éléments qui échappent à l'analyse sensorielle comme le méthanol, le sodium, les acides aminés, des éléments exogènes divers, nous considérons comme le précise RANKINE (1974) que « la dégustation est essentielle pour apprécier le vin ».

Aussi, l'analyse sensorielle qu'elle soit à caractère technologique afin de rapprocher les données analytiques des impressions organoleptiques ou à caractère écologique pour s'assurer de la typicité du produit, apparaît comme précieuse pour orienter rationnellement les productions viticoles.

Comme toute analyse, il faut s'assurer des conditions de la mesure et des performances de l'appareil. Ce point est parfaitement souligné par DEPLEDT (1976) qui dit « ce n'est que lorsqu'on dispose ainsi de personnes qualifiées qu'on peut obtenir en métrologie sensorielle une bonne reproductibilité si les conditions d'expérience sont bien remplies ».

L'œnologie moderne, en assurant la formation de dégustateurs, en harmonisant les méthodes et conditions d'analyse sensorielle, offre à la profession vitivinicole et aux consommateurs des moyens complémentaires et efficaces permettant d'attribuer aux vins le niveau de qualité auquel ils prétendent.

Summary

The organoleptic quality control: techniques and tasting

Sensorial analysis seems to be an indispensable additional technique for the appreciation of all elements present in human foods. Like all technical analyses it must be perfectly defined in order to be objective.

Organoleptic quality control of wines will therefore depend on both the training of tasters and the detailed description of tasting conditions. Taster training seems indispensable and is urgently required. It must be based on the physiological aspects of sensing, specifying the totality of perceived stimulations and the factors, both internal and external, which can modify the performance of the taster. The exercises and the frequency of their use during the training program are essential to maintain the measuring instruments in perfect condition. The organisation of the materials used and the tasting-room must fulfil specific criteria concerning the nature of the materials, the dimensions and the equipment. The sensorial exam program should be planned by specialists who should only ask of the tasters that which they are capable of answering, taking into account their powers of memory. This planning would lead to the development of perfectly adapted tasting sheets so that the sensorial analysis will have technical, ecological and economic importance.

Key-words: *Wines — Sensorial exam — Taster training — Testing — Planning.*

Références bibliographiques

Norme AFNOR AF V 00 150, décembre 1968 et mai 1971.

Norme AFNOR V 09 002, avril 1971.

Norme AFNOR NF V 09 110, juin 1971.

Norme AFNOR V 09 012, avril 1972.

Norme AFNOR NF V 09 105, mai 1972.

ARON, ROUGEREAU A., LASNIER H., PUISAIS J., 1973. Le seuil gustatif ches les diabétiques, Congrès de Tours, *Rev. Fse Oenologie*, **51**, 21-22.

CHOCHOLLE, 1974. Psychopathologie des bruits, *Courrier de normalisation.*

DEPLEDT F., 1976. *Conn. Vigne Vin*, **10** (4), 345-357.

INSTITUT DE LA VIGNE ET DU VIN, Plan d'une salle de dégustation, Institut de la Vigne et du Vin d'El Arrach.

LEGLISE M., 1976. *Initiation à la dégustation des grands vins.* Divo éd., Lausanne.

PUISAIS J., CHABANON R. L., GUILLER A., LACOSTE J., 1969. *Précis d'initiation à la dégustation*, I.T.V. éd., Paris.

RANKINE B. C., 1974. *Wine tasting and judging Food Technology in Australia*, The Australian Research Institute.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1972 et 1975, *Sciences et Techniques du Vin*, Tome I et II, Dunod-Bordas éd., Paris.

ROMIEUX A., ROUGEREAU A., PUISAIS J., 1973. Modification de l'appareil gustatif sur l'influence de divers matériaux prothétiques, Congrès de Tours, *Rev. Fse Oenologie*, **52**, 13-16.

ROUGEREAU A., 1974. Évolution des seuils de perception sensorielle en fonction des mets et des vins, Congrès de Dijon. *Rev. Fse Oenologie*, **54**, 28-33.

ROUGEREAU A., 1975, Gustation, facteurs de variations et comportement alimentaire, *Bull. Acad. Nationale Chirurgie dentaire.*

ROUGEREAU A., BERENHOLC C., 1969. Action de l'alcool sur le pouvoir tampon salivaire. Colloque Oenologique de Tours, *Vignes et Vins*, n° *spécial*, 68-71.

ROUGEREAU A., GORE J., PUISAIS J., 1975. Variations des seuils gustatifs chez la femme en relation avec le cycle sexuel, Congrès de Colmar, *Rev. Fse Œnologie*, **58**, 47-48.

ROUGEREAU A., PUISAIS J., LASNIER H., BERENHOLC C., 1973. Usages alimentaires et perception gustative, Congrès de Tours, *Rev. Fse Œnologie*, **51**, 24-28.

ROUGEREAU A., PUISAIS J., LASNIER H., GARE J., 1973. Évolution de la perception gustative en fonction du type d'alimentation chez l'homme, *J. de Physiologie*.

ROUGEREAU A., PUISAIS J., MARTIN, TREMOLIÈRES J., 1960. Influence du bruit sur l'activité digestive.

ROUGEREAU A., ROMIEUX A., GORE J., PUISAIS J., 1900. Variations physiologiques des seuils gustatifs chez l'homme, *Cahiers Odonto-Stomatologie*.

VEDEL A., CHARLE G., CHARNAY P., TOURMEAU J., 1972. *Essais sur la dégustation des vins*, I.N.A.O., SEIV éd., Macon.

———————

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 367-375

Caractérisation des raisins et des vins à l'aide de certains constituants remarquables

F. DRAWERT et P. SCHREIER

Institüt fur Lebensmitteltechnologie
und Analytische Chemie der Technischen
Universität München
(Bundesrepublik Deutschland)

Résumé

Parmi plusieurs centaines de substances aromatiques du vin, identifiées jusqu'à présent par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, celles qui sont les plus typiques d'un cépage donné, sont celles qui passent du raisin au vin. Étant donné leur faible concentration, elles doivent être appelées des oligo-composants. Le plus souvent à cause de leur stéréo-sélectivité, elles ne possèdent que des caractéristiques sensorielles très faibles.

Ce sont surtout les terpènes. Une méthode de dosage a été élaborée consistant en un préfractionnement sur Kieselguhr et en la détermination par chromatographie en phase gazeuse quantitative des différentes fractions.

Cette détermination quantitative permet de différencier les vins issus de différents cépages.

Mots clés : *Raisins — Vins — Composés aromatiques — Terpènes — Fractionnement — Dosage.*

Grâce au développement de méthodes analytiques modernes et sensibles telles que la chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse, l'électrophorèse sur gel et l'électrofocalisation, la chromatographie d'échange d'ions et la chromatographie en phase liquide, il a été possible de montrer que non seulement le vin mais aussi les raisins sont composés de plusieurs centaines de substances de concentrations très variées. On ne peut analyser ces mélanges complexes que si l'on peut préalablement séparer les composants ou si une réaction spécifique permet de déterminer une substance dans le mélange (dosage enzymatique).

Outre les substances connues depuis des années, les acides par exemple, on a pu détecter beaucoup d'autres composés dans les vins issus de cépages divers; ces composés n'existent qu'à faible concentration. Ce sont par exemple des alcools, esters, aldéhydes, cétones, acétals, hydrocarbures, acides organiques, combinaisons

soufrées, combinaisons phénoliques, ainsi que de nombreux terpènes (WEBB, 1967; WEBB et MULLER, 1972; DRAWERT et RAPP, 1968; DRAWERT *et al.*, 1974; SCHREIER et DRAWERT, 1974 (*a*, *b*); SCHREIER *et al.*, 1974 (*c*), 1975 (*a*).) La plupart de ces substances sont aromatiques, si l'on regroupe sous ce terme, selon la définition, les substances influençant odeur et saveur.

On ne peut expliquer la composition complexe du vin : substances chimiques très différentes, concentrations s'étalant sur plusieurs puissances de 10, seuils de perception sensoriels très différents, que si l'on considère celui-ci comme le dernier maillon d'une chaîne non seulement biologique mais encore biotechnologique (DRAWERT, 1974; DRAWERT et RAPP, 1966; DRAWERT et SCHREIER, 1965, 1966; DRAWERT *et al.*, 1965 (*a*, *b*), 1967; SCHREIER et DRAWERT, 1974 (*a*); SCHREIER *et al.*, 1974 (*a*)). La complexité commence dès le raisin dont la composition dépend des régions et des cépages; elle continue avec les modifications apportées par la maturation, l'état de la vendange, les techniques appliquées (foulage). Cette chaîne se poursuit avec la fermentation levurienne qui apporte d'importants changements par créations de nouvelles substances; elle se termine par la maturation du vin lors du stockage.

Considérant ainsi le problème, on peut alors se demander d'où viennent et où naissent ces substances (DRAWERT et SCHREIER, 1965, 1966; DRAWERT *et al.*, 1965 (*a*, *b*), 1967; SCHREIER et DRAWERT, 1974 (*a*); SCHREIER *et al.*, 1974 (*a*), 1975 (*a*, *b*). L'utilisation de composés radioactifs a permis d'aboutir à deux résultats importants :

— Les différences les plus significatives entre différents vins sont surtout quantitatives.

— Les différences significatives entre différents cépages sont à chercher parmi les oligo-substances aromatiques qui, à cause de certaines stéréo-sélectivités, ont des seuils de perception sensorielles faibles.

Ces constatations ont naturellement des conséquences analytiques importantes : d'une part, il faut comparer l'inventaire des substances aromatiques des vins à celui des moûts; d'autre part, il faut s'orienter vers les déterminations quantitatives. C'est pourquoi nous avons établi également l'inventaire des composants du raisin (SCHREIER *et al.*, 1974 (*b*), 1976 (*a*, *b*, *c*)) et mis au point des méthodes de dosage appropriées. Ce faisant, nous avons tenu compte du fait que ce sont des oligo-composants tels que les terpènes qui permettent le mieux de différencier les cépages. La détermination quantitative des oligo-composants du vin soulève quelques problèmes : les substances polaires, des alcools d'huiles de fusel par exemple, gênent le dosage par chromatographie en phase gazeuse des oligo-composants non polaires. C'est pourquoi nous avons extrait les composants non polaires par du *n*-pentane. Après addition d'un étalon et concentration à 0,5 ml par chauffage à 50 °C, ces extraits ont été préfractionnés sur Kieselgel 60 (Merck) degré d'activité 2, avant la séparation chromatographique.

Selon ce mode opératoire, nous avons obtenu les fractions I à IV et séparé leurs composants aromatiques (tabl. 1). Les chiffres correspondent aux numéros d'ordre des pics dans les chromatogrammes non représentés. L'octanoate de méthyle a été utilisé comme étalon externe (pic n° 8). On peut remarquer les substances aromatiques dont la séparation est facile à obtenir. Nous voyons par exemple que la benzaldéhyde (pic n° 10) est nettement séparé du linalol (pic n° 19). Le phénylacétate d'éthyle et l'acétate de phényl-2 éthyle ne sont élués que relativement tard mais sont bien séparés des esters hydroxy-2 carboxyliques. A l'intérieur de chaque fraction, la plupart des composants sont bien séparés; ce n'est que lorsque la polarité augmente qu'apparaissent des chevauchements des différentes fractions :

TABLEAU I

Substances aromatiques identifiées après extraction au pentane, fractionnement sur gel de silice, identification CG/SM

	N° des pics dans les chromatogrammes non représentés			
	Fraction I P + D (230 + 30 ml)	Fraction II P + D (170 + 30 et 25 + 30 ml)	Fraction III P + D (75 + 75 et 10 + 40 ml)	Fraction IV P + D (30 + 110 et 50 ml)
Acétate d'isobutyle	1			
Butyrate d'éthyle	2			
Méthyl-2 butyrate d'éthyle	3			
Méthyl-3 butyrate d'éthyle	4			
Acétate d'isopentyle	5			
Hexanoate d éthyle	6			
n-acétate d'hexyle	7			
Oxydes de rose (cis + trans)	7*a*/*b*			
Octanoate de méthyle (étalon externe)	8	8	8	8
Octanoate d'éthyle	9			
Oxyde de nérol	10			
Benzaldéhyde	10*a*			
Décanoate d'éthyle	11			
Furanne-2 carboxylate d'éthyle	11*a*			
Octanoate d'isopentyle	12			
Phénylacétate d'éthyle	12*a*			
Laurate d'éthyle	13			
Acétate de phényl-2 éthyle	14			
Succinate de méthyle éthyle		15		
Succinate de diéthyle		16		
Succinate d'éthyle isobutyle		17		
Succinate d'éthyle isopentyle		18		
Linalol		19		
Malonate diéthyle		20		
Ho-trienol		21	21	
Glutarate diéthyle		22		
Hydroxy-2 isovalérianate d'éthyle		23	23	
Hydroxy-2 méthyl-3 pentanoate d'éthyle		24		
Hydroxy-2 méthyl-4 pentanoate d'éthyle		25	25	
Oxyde de linalol cis			26	
Oxyde de linalol trans			27	
Lactate d'isopentyle			28	
Méthyl-2+3 butanol-1			29	29
Lactate d'éthyle			30	30
Hexanol-1			31	31
Lactate d'isobutyle			32	
α-terpinéol			33	
Méthyl-2 propanol-1			34	34
Pentanol-1				35
Hexène-3 ol 1 cis				36
Hexène-2 ol 1 trans				37
Heptanol-1				38
Octanol-1				39
Nonanol-1				40
Oxyde de linalol crist				41
Nérol				42
Géraniol				43
Alcool benzylique				44
Phényl-2 éthanol				45

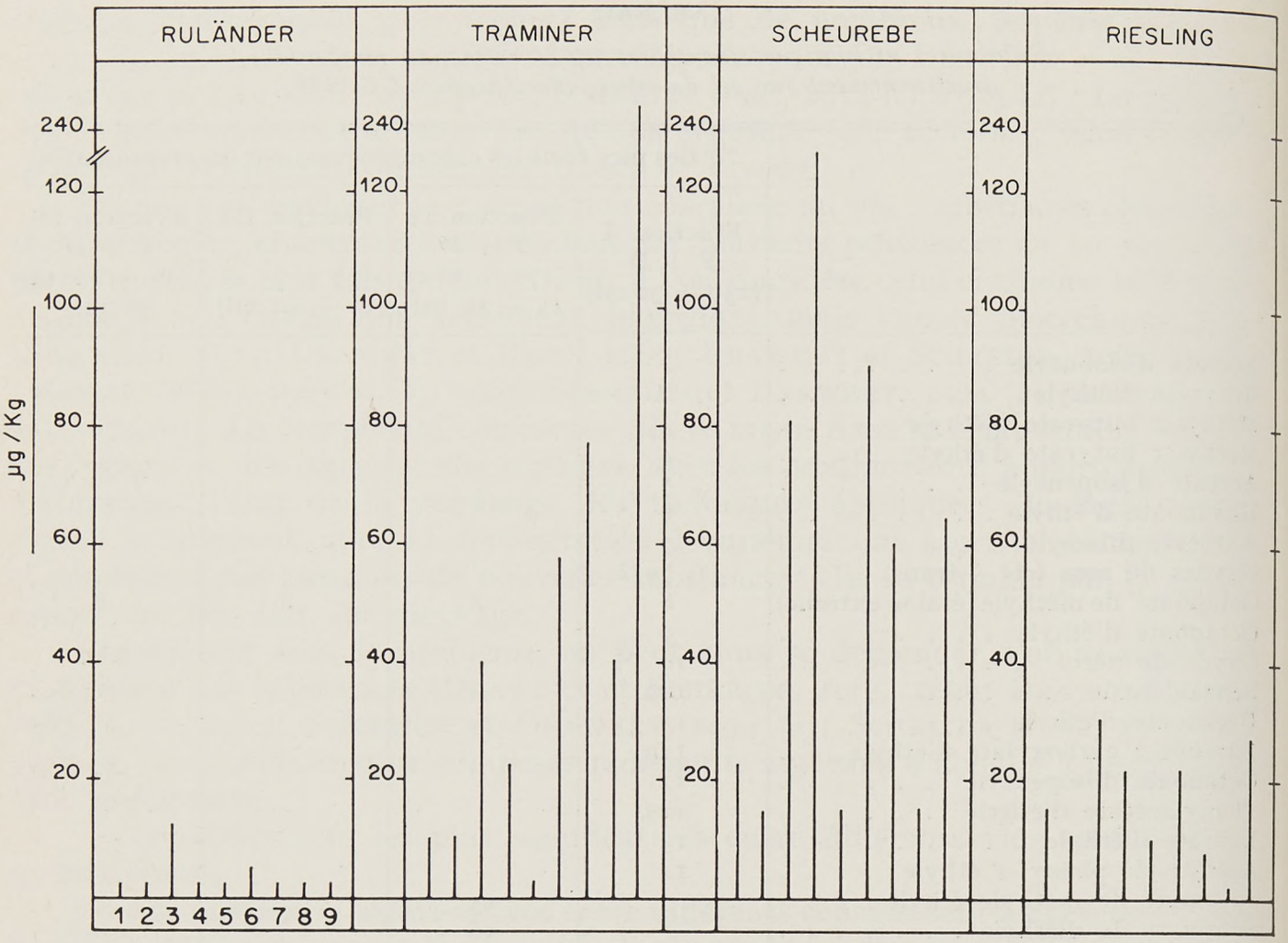


FIG. 1. — *Représentation graphique des teneurs en oxydes de linalol et en différents alcools terpéniques dans les raisins des cépages : Ruländer, Traminer, Scheurebe, Riesling.*

1 : oxyde de linalol cis
2 : oxyde de linalol trans
3 : linalol
4 : hotriénol
5 : terpinéol
6 : oxyde de linalol (isomère liquide)
7 : oxyde de linalol (isomère crits.)
8 : nérol
9 : géraniol

FIG. 2. — *Représentation graphique des teneurs en substances aromatiques des vins provenant des cépages Schreube, Ruländer, Gewürtz-Traminer, Morio-Muscat, Riesling et Muller-Thurgau.*

1 : oxyde de rose (cis + trans)
2 : oxyde de nérol
3 : linalol
4 : hotrienol
5 : oxyde de linalol cis
6 : oxyde de linalol trans
7 : terpinéol
8 : oxyde de linalol crist. (pyranoïde)
9 : nérol
10 : géraniol
hW : valeur maximale,
mW : valeur moyenne,
nW : valeur minimale.

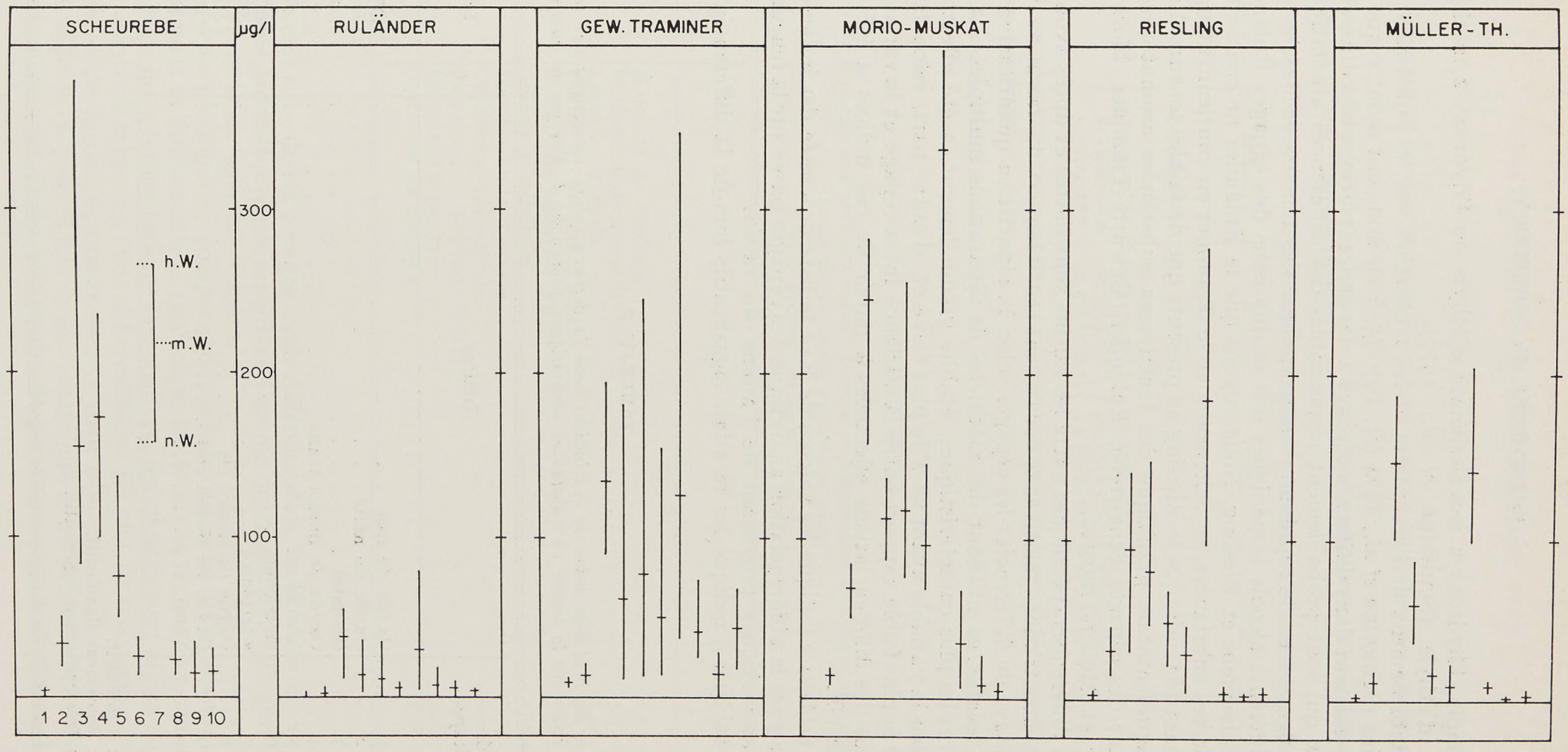

SCHEUREBE
µg/l
RULÄNDER
GEW. TRAMINER
MORIO-MUSKAT
RIESLING
MÜLLER-TH.
300
200
100
h.W.
m.W.
n.W.
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIG. 2.

par exemple, l'hydroxy-2 isovalerianate d'éthyle ou l'hydroxy-2 méthyl-4 pentanoate d'éthyle (SCHREIER *et al.*, 1977).

L'établissement de l'inventaire et les recherches sur les substances volatiles des raisins (SCHREIER *et al.*, 1974 (*b*), 1976 (*a*, *b*, *c*)) nous ont montré que quelques terpènes existent dans différents cépages à des concentrations très différentes et ce sont eux qui sont probablement responsables des différences aromatiques.

La figure 1 est la représentation graphique des teneurs en oxydes de linalol et en différents alcools terpéniques des raisins issus des cépages Ruländer, Traminer, Schewrebe et Riesling. Nous voyons que le Ruländer ne contient que des traces de ces substances, le Schewrebe et le Traminer en contiennent une importante quantité tandis que le Riesling ne présente que de faibles teneurs. La figure 2 est la représentation graphique des teneurs en substances aromatiques des vins provenant des cépages Schewrebe, Ruländer, Gewürtz-Traminer, Morio-Muscat, Riesling et Muller-Thurgau.

Les différences spécifiques entre les raisins sont nettes et après avoir constaté que les concentrations relatives se conservent sensiblement du raisin au vin, nous avons essayé de différencier les cépages selon la répartition quantitative des composants volatils, en utilisant des méthodes de séparations multiples. La sélection des indices les plus caractéristiques, établie graduellement, a été effectuée d'une part, selon la variable ayant un F le plus élevé et, d'autre part, selon la variable donnant le plus faible rapport entre la variance intra-cépage et la variance totale. La valeur des différenciations effectuées à partir de ces indices a été éprouvée par le test-F.

Le tableau 2 indique les valeurs de F et la liste ordonnée des indices caractéristiques pour la différenciation analytique des cépages basée sur la teneur en substances aromatiques provenant de l'arôme du raisin.

Le tableau 3 indique les résultats significatifs lors de la différenciation ana-

TABLEAU 2

Valeur de F et liste ordonnée des indices pour la différenciation analytique des cépages basée sur la teneur en substances aromatiques provenant de l'arôme du raisin

Ordre des étapes	Indices	Test-F
1	Oxyde de rose	39,3871***
2	Oxyde de nérol	21,6445***
3	Géraniol	8,2183**
4	Oxyde de linalol trans	5,3712**
5	Linalol	3,4888*
6	Hotrienol	2,6691*
7	α-terpinéol	1,0854
8	Oxyde de linalol cis	1,0391
9	Oxyde de linalol cris	2,1286
10	Nérol	0,4814

* : Significatif.
** : Hautement significatif.
*** : Très hautement significatif.

TABLEAU 3

Valeurs de F calculées pour tester la différenciation analytique des cépages
(Degrés de liberté : 10 et 15)

Cépages : Scheu : Scheurebe; Rul : Ruländer; Gew : Gewurztraminer; Mor : Morio-Muskat; Rie : Riesling; Mül : Müller-Thurgau.

Cépages	Scheu.	Rul.	Gew.	Mor.	Rie.
Rul.	12,26851***	—	—	—	—
Gew.	20,47943***	13,14349***	—	—	—
Mor.	12,72969***	28,34743***	26,26994***	—	—
Rie..	2,55088 n.s.	6,53952***	19,13185***	12,28569***	—
Mül.	5,92097***	2,57932 n.s.	15,77784***	16,96878***	1,48494 n.s.

n.s.: non significatif.

TABLEAU 4

Valeurs de F et liste ordonnée des indices pour la différenciation analytique des cépages basée sur la teneur en certains esters
(*sans produits de fermentation*)

N° des étapes	Indices	Test-F
1	Malonate de diéthyle	6,0375**
2	Méthyl-2 butyrate d'éthyle	5,1868**
3	Laurate d'éthyle	2,4800
4	Méthyl-3 butyrate d'éthyle	1,3745
5	Acétate de phényl-2 éthyle	1,2869
6	Acétate d'isobytule	1,0345
7	Phénylacétate d'éthyle	0,9713
8	Octanoate d'isopentyle	0,9002
9	Furanne-2 carboxylate d'éthyle	0,8671
10	Lactate d'isopentyle.	0,3471
11	Glutarate de diéthyle	0,1697

lytique de vins issus de six cépages, cette différenciation étant basée sur les teneurs en substances aromatiques provenant de l'arôme du raisin. On voit que les différenciations sont en général bonnes.

Le tableau 4 indique, en comparaison, la liste ordonnée des composants caractéristiques pour la différenciation analytique basée sur la teneur en certains esters (sous-produits de la fermentation). Les résultats significatifs sont moins nombreux comme le montre le tableau 5 : une différenciation de vins de 6 cépages n'est guère possible de cette façon (SCHREIER *et al.*, 1976 (*d*)).

Il est utile de disposer d'une image analytique détaillée des différents groupes de substances des vins et des moûts afin de porter un jugement global. La chro-

TABLEAU 5

Valeurs de F établies pour tester la différenciation analytique des cépages basée sur la teneur en certains esters (sous-produits de fermentation)

(Degrés de liberté : 11 et 14)

Cépages : Scheu : Scheurebe; Rul : Ruländer, Gew : Gewürztraminer, Mor : Morio-Muskat; Rie : Riesling; Mül : Müller-Thurgau.

Cépages	Scheu.	Rul.	Gew.	Mor.	Rie.
Rul.	0,63581 n.s.	—	—	—	—
Gew.	2,25112 n.s.	1,59908 n.s.	—	—	—
Mor.	1,24486 n.s.	1,99553 n.s.	3,30600 n.s.	—	—
Rie..	1,02439 n.s.	1,57925 n.s.	4,27324*	1,65795 n.s.	—
Mül.	1,52459 n.s.	1,30886 n.s.	1,29488 n.s.	1,14644 n.s.	2,10461 n.s.

n.s.: non significatif.

matographie en phase gazeuse étant une méthode de choix, du point de vue séparation et sensibilité, nous avons donc également étudié par cette méthode les substances non volatiles : combinaisons phénoliques, acides organiques, hydrates de carbone (substances neutres) et les amino-acides, par la séparation dite de groupe et en utilisant des dérivés de ces substances.

Summary

Characterization of the grapes and wines by certain typical fractions

The most typical aromatic wine substances among the hundreds now identified by gas chromatography and mass spectrometry are, for a given grape variety, those which pass from the grape into the wine. Owing to their low concentrations, they must be called the oligo-components. Usually, because of their stereo-selectivity they possess only minor sensorial characteristics.

Of these substances the terpenes are the most common. A method for the determination of these substances involving a prefractionation on kieselguhr (diatomaceous earth) and the quantitative measurement of the different fractions by gas chromatography has been introduced.

This quantitative determination allows a differentiation of wines made from differing grape varieties.

In order to complete the analysis tables for wines a procedure for separating phenols, organic acids, sugars and amino acids has also been introduced. This procedure allows in the case of phenols a semi-quantitative determination, and in the case of the other substances quantitative analyses.

Key-words: *Grapes — Wines — Aromatic substances — Terpenes — Fractionation — Dosage.*

Références Bibliographiques

DRAWERT F., 1974. *In Chemistry of Winemaking*, A. D. WEBB ed., p. 1-10, *Amer. Chem. Soc.*, Washington.

DRAWERT F., RAPP A., 1966 (*a*). *Vitis*, **5**, 351-376.

DRAWERT F., RAPP A., 1968. *Chromatographia*, **1**, 446.

DRAWERT F., RAPP A., ULLEMEYER H., 1967. *Vitis*, **6**, 177-197.

DRAWERT F., RAPP A., ULRICH W., 1965 (*a*). *Vitis*, **5**, 20-23.

DRAWERT F., RAPP A., ULRICH W., 1965 (*b*). *Naturwissenschaften*, **52**, 306.

DRAWERT F., SCHREIER P., LEUPOLD G., KERENYI Z., LESSING V., JUNKER A., 1976. *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **162**, 11.

DRAWERT P., SCHREIER P., SCHERER W., 1974. *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **155**, 342.

DRAWERT F., STEFFAN H., 1965 (*c*). *Vitis*, **5**, 27-34.

DRAWERT F., STEFFAN H., 1966 (*b*). *Vitis*, **5**, 377-384.

SCHREIER P., DRAWERT F., 1974 (*a*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **154**, 27.

SCHREIER P., DRAWERT F., 1974 (*b*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **154**, 273.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1974 (*c*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **154**, 279.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1974 (*d*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **155**, 98.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1974 (*e*). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **3**, 154.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1975 (*f*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **157**, 34.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1975 (*g*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **158**, 351.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1976 (*h*). *Z. Lebensm. u. Forsch.*, **160**, 271.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1976 (*i*). *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 331.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1976 (*j*). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **4**, 154.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1977 (*k*). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **5**, 45.

SCRHEIER P., DRAWERT F., JUNKER A., REINER L., 1976 (*l*). *Mitteillungen Klosterneuburg*, **26**, 225.

WEBB A. D., 1967. *in Symposium on Foods : Chemistry and Physiology of Flavors*, H. W. Schiltz, E. A. Day et L. M. Libbey, eds., Westport, AVI publ. Comp.

WEBB A. D., MULLER C. J., 1972. *Adv. Appl. Microbiol.*, **14**, 75.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 377-379

INTERVENTION

La caractérisation des vins, base essentielle de la délimitation des zones de production

F. A. COLAÇO de ROSARIO

Institut Universitaire d'Evora (Portugal)

Introduction

Après une période assez longue, pendant laquelle la délimitation des zones de vins ayant des caractéristiques communes se faisait essentiellement par la tradition complétée de données techniques, de nouvelles perspectives semblent être ouvertes.

La caractérisation physique et chimique des vins n'a pas été un élément dominant dans la définition de zones de production. La dégustation fut le principal facteur de la tradition mais sa subjectivité constitue un obstacle par sa généralisation dans la caractérisation courante des vins.

On n'avait pas de moyens développés pour établir une classification des vins basée sur un grand nombre de caractéristiques et en déduire des zones de production ayant des caractéristiques communes.

Actuellement un tel but est possible par une méthode d'analyse pluridimensionnelle — la taxonomie numérique.

Méthodologie essentielle de la taxonomie numérique appliquée au vin

Basée sur la méthodologie générale présentée par Lima, son application à la classification des vins du Sud du Portugal après un échantillonnage des vins dans les caves coopératives et obtention d'analyses physico-chimiques et organoleptiques dans les laboratoires des services officiels, se fait de la façon suivante :

— Sélection de 24 caractéristiques élémentaires, toutes de poids égal. Dans la dégustation on a tenu compte des sensations individuelles quantifiées d'après le système de classification utilisé au Concours International de Bucarest en 1968.

— Codification des caractéristiques pour chaque vin et respective standardisation.

— Calcul des matrices par détermination de coefficients de distance et corrélation entre les vins.

— Obtention de phénogrammes où on observe le groupement des vins par le degré de ressemblance des différentes caractéristiques dans leur ensemble.

— Calcul des composantes principales, qui permet la projection des vins et des caractéristiques dans l'espace pluridimensionel. Ces calculs ont été effectués par ordinateur, utilisant le programme MINT (Mini-numerical taxonomy).

Interprétation des résultats

A partir du phénogramme de corrélations (fig. 1) et de la projection des vins (fig. 2) il est possible de donner une idée de l'information obtenue. Ainsi on observe une plus large homogénéité des vins au niveau de chaque cave. Dans leur groupe

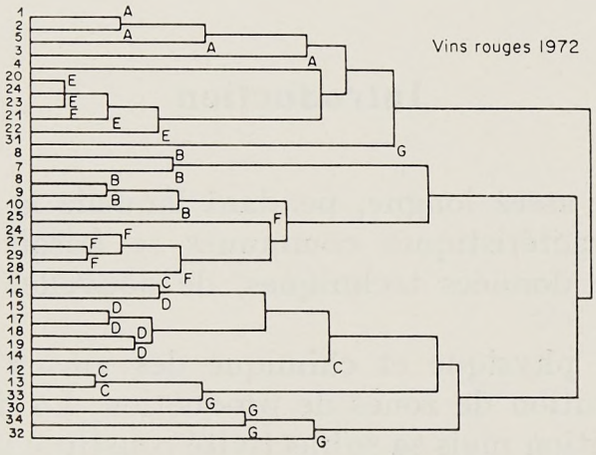


FIG. 1. — *Phénogramme de corrélations vins rouges 1972.*

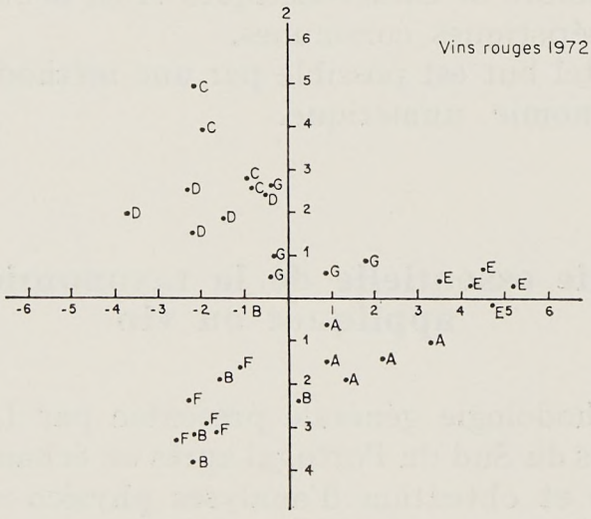


FIG. 2. — *Projection des vins rouges 1972.*

ment, il y a tendance à la constitution de trois grands groupes comme nous pouvons constater plus clairement dans le phénogramme de corrélations :

B — F; A — E; C — D — G.

Conclusions

Par l'utilisation de cette méthode d'analyse pluridimensionnelle on peut s'attendre à une contribution décisive dans la caractérisation des vins et aussi dans leur utilisation pour la définition de zones à caractéristiques communes. Les données utilisées pour cet essai de la méthodologie indiquée, concernent la production de 1972. A l'heure actuelle on travaille avec les données de la production de quatre années, utilisant la même méthode, dans le but de définir :

— L'incidence des caractéristiques de la dégustation dans les résultats obtenus.

— Les caractéristiques fondamentales pour la caractérisation des vins et leur classification par l'utilisation de cette méthode dans des travaux de routine à niveau officiel.

— Les possibilités de délimitation de zones de vins à caractéristiques communes dans l'Alentejo, comme apport à la définition de zones d'appellation d'origine contrôlée dans un avenir plus ou moins proche.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 381-382

INTERVENTION

Détermination du millésime des vins en Gironde par la mesure de la radioactivité du carbone 14

P. MARTINIÈRE, M. GAULTIER, J. SEVERAC,
P. SUDRAUD, et J. L. CAUSSANEL

Station agronomique et œnologique
Université de Bordeaux II (France)

Le carbone 14 a toujours été présent dans l'atmosphère à un taux qui s'est situé à un niveau de 13 à 13,5 désintégrations par min et par g de carbone jusqu'en 1950. A partir de cette année et jusqu'en 1963 ce taux s'est accru pour atteindre un niveau d'activité de deux fois à deux fois et demi celui des années antérieures aux essais nucléaires. A partir de 1963, après l'arrêt des explosions nucléaires dans l'atmosphère, l'activité a diminué très rapidement. Des résultats ont été déjà publiés concernantd'autres régions et ont montré que les variations de la concentration en carbone 14 de l'alcool des vins traduisaient les variations de la concentration en carbone 14 de l'atmosphère et permettaient ainsi la détermination des millésimes.

Nous avons repris cette étude avec des vins en provenance des différentes appellations de la Gironde et mesuré l'activité de ces vins d'origines et de millésimes connus. A partir des résultats obtenus, nous avons cherché un modèle mathématique qui rende compte du résultat. L'évolution des quantités de désintégrations en fonction du temps est très bien décrite par une relation fonctionnelle de la forme :

$$(1) \qquad f(t) = \lambda + \mu . e^{-\delta t} + \upsilon . e^{-\varepsilon t}$$

L'origine des temps a été choisie en 1964 et l'unité de temps est l'année. λ, μ, δ, υ, ε sont cinq constantes et leur détermination présente de sérieuses difficultés mathématiques.

Pour tenir compte de l'importance relative des erreurs de mesure, nous avons dû déterminer deux fonctions du type (1) précédent conduisant à deux courbes entre lesquelles doit se trouver la courbe idéale.

L'équation réelle des fonctions est la suivante :

$$(2) \qquad f(t) = 12{,}1306 + 1{,}7902 e^{-0{,}8884\,t} + 11{,}0761 e^{-0{,}0532.t}$$

$$(3) \qquad f(t) = 11{,}9865 + 1{,}7107 e^{-0{,}8560\,t} + 10{,}8998 e^{-0{,}0541.t}$$

Le niveau de radioactivité doit tendre vers une valeur limite qui se situe aux environs de 12 désintégrations par min et par g de carbone et qui ne sera atteinte que dans une centaine d'années, si aucun événement ne vient perturber cette décroissance. Nous pouvons constater que le niveau d'équilibre atteint sera nettement inférieur à celui des années antérieures à 1950 (qui était de 13,5 *dpm* /g de carbone).

L'existence de deux courbes signifie que pour un résultat donné avec une certaine marge d'erreur, on n'obtient pas un point, mais une surface (S) dans laquelle doit se trouver le point exact.

Prenons l'exemple d'un Médoc de l'année 1976 ayant une activité de 17,982 dpm et par g de carbone avec une erreur relative de 0,171 : nous aboutissons à un millésime de 1975 ou 1976.

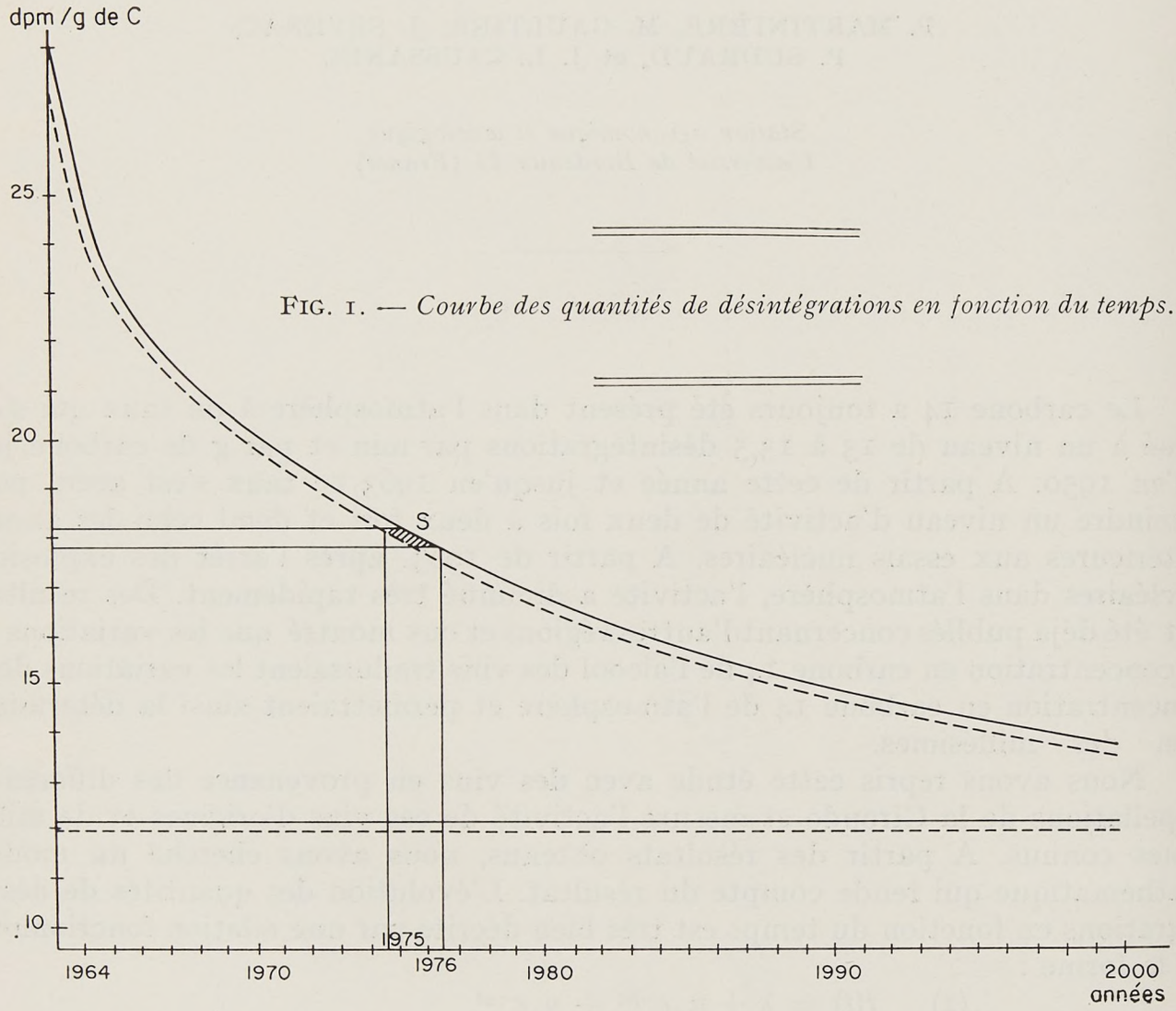


FIG. 1. — *Courbe des quantités de désintégrations en fonction du temps.*

Cette incertitude d'une année existe parce que la figure représente les résultats de l'ensemble du vignoble girondin et il a donc fallu tenir compte de la dispersion des résultats sur l'ensemble des aires d'appellation.

La poursuite de notre étude nous a montré que les diverses zones viticoles de la Gironde avaient des évolutions légèrement différentes et l'étude mathématique indique que pour affiner les déterminations, il y avait lieu de considérer chaque appellation séparément. Un travail est en cours actuellement dans ce sens.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 383-393

La rémanence des produits de traitement viticole antifongique et leur influence sur la vinification

J. F. SCHOPFER

École Supérieure de Viticulture, d'Oenologie et d'Arboriculture de Changins, Nyon (Suisse)

Résumé

L'auteur rapporte les résultats des recherches effectuées en Suisse sur la rémanence des fongicides utilisés pour la lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*).

Les fongicides de surface : dichlofluanide et folpet ont une action inhibitrice sur les levures; leurs résidus dans le moût empêchent le départ de la fermentation; cependant, en milieu acide, ces substances s'hydrolysent et perdent ce pouvoir inhibiteur; la fermentation peut repartir ensuite.

Les fongicides récents, dérivés de la dichloraniline (3,5-DCA), n'ont pas d'action sur les levures et n'induisent aucun faux goût dans les vins. Il est difficile de savoir la dose de leurs résidus que contient un vin; ce résidu peut être éliminé par divers traitements.

Mots clés : *Vinification — Fongicides — Résidus — Action — Élimination.*

Introduction

La viticulture mondiale ne pourra être sauvée que moyennant une politique de qualité de la viticulture, de la vinification et du vin. C'est là une vérité dont l'évidence s'affirme de plus en plus aux yeux de chacun. La lutte contre les parasites de la vigne fait partie de l'ensemble des mesures prises par l'homme dans ce but.

La découverte de nouveaux produits organiques par l'industrie chimique, produits d'une efficacité toujours meilleure, facilite le travail des vignerons et permet d'obtenir des rendements qualitatifs toujours meilleurs et des vendanges en bonne santé. Ces nouveaux fongicides ont permis en particulier de lutter très efficacement contre la pourriture grise de la vigne, due à *Botrytis cinerea*, qui posait de graves problèmes de vinification. Elle est dangereuse à deux époques : au moment de la véraison où elle attaque les grains qui peuvent se dessécher et donner

des zones de grains secs et pourris sur lesquelles se développent parfois en plus de la pourriture verte (*Penicillium*) ou noire (*Aspergillus*) qui peuvent communiquer au moût des faux goûts de moisi extrêmement dangereux. Elle peut aussi se développer de façon foudroyante quelques jours avant les vendanges, compliquant de façon sensible les travaux de réception des raisins à la cave, d'extraction des moûts blancs et de cuvage des rouges. On arrive par ces traitements à réduire les dégâts à quelques pour cents de ceux de parcelles non traitées.

Simultanément, on assiste à une modification des structures vinicoles : très souvent ce n'est plus le vigneron qui est responsable de la vinification de ses récoltes: il livre sa vendange à une cave coopérative ou à un marchand de vin; il est alors tenté de protéger sa récolte au maximum afin d'en tirer le meilleur profit; il aura tendance à utiliser des quantités plus élevées de produits de traitement ou à traiter plus tardivement ses vignes.

Le consommateur est aujourd'hui très fortement sensibilisé aux problèmes de l'environnement : en particulier il redoute les résidus de produits de traitements dans toutes les denrées alimentaires et particulièrement dans les vins. Les gouvernements des pays ont ainsi été amenés à réglementer les quantités maxima de résidus tolérées dans les différentes denrées alimentaires.

Ce problème est très complexe : il fait intervenir le cépage, le climat, les facteurs humains, les phénomènes fermentaires, etc. Il mérite d'être étudié très à fond.

Historique du problème

C'est vers 1966 que sont apparus les premiers fongicides organiques à haute efficacité contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), notamment le folpet et le dichlofluamide.

Les recherches entreprises à leur sujet ont porté immédiatement sur les deux aspects essentiels du problème :

L'aspect viticole

Efficacité du nouveau fongicide, doses à employer, dates de traitement, date limite pour effectuer le dernier traitement.

L'aspect œnologique

Peut se résumer facilement : quel est l'effet, sur le vin prêt à la consommation, de l'utilisation de ces nouveaux fongicides en viticulture?

On peut le diviser schématiquement en trois parties :

- Taux de rémanence des produits fongicides sur les raisins à la vendange, dans le moût, au cuvage et dans le vin prêt à consommer.
- Effet de ces résidus dans le moût, sur les phénomènes fermentaires.

Ces résidus étant antifongiques, il est à craindre qu'ils n'aient un effet sur les levures qui sont des Ascomycètes et peut-être sur les bactéries lactiques.

• Effets des résidus sur les qualités organoleptiques des vins terminés; ces effets peuvent être de deux sortes :

— un effet direct, attribuable à la présence du résidu dans le vin, donnant un mauvais goût,

— un effet indirect : le résidu modifie les phénomènes fermentaires ou les réactions chimiques en cours de vinification, donnant naissance à des substances nouvelles responsables d'un faux goût.

Une première étude a consisté à rechercher les effets des divers fongicides existant en 1965 sur les levures. Elle a montré, dans l'ordre décroissant quels étaient approximativement, pour les levures, les seuils d'inhibition des divers fongicides : Difolatane (2 mg/l), Dichlofluanide (10 mg/l), Captane (5 mg/l), Folpet (10 mg/l), Manèbe (10 mg/l); Dinocap, Métirame et Zinèbe n'ont pas d'effet jusqu'à la dose de 100 mg/l.

Essais avec le dichlofluanide et le folpet

Les traitements les plus dangereux sont ceux contre la pourriture grise, parce que ce champignon se développe très tard et de façon souvent très rapide; nos premières recherches se sont donc portées sur les deux fongicides folpet et euparène.

Les essais de traitement sont effectués sur des vignes exclusivement affectées à ces recherches. Les traitements contre les autres parasites sont normaux; les traitements contre *Botrytis cinerea* sont suivis très attentivement jusqu'à la vendange et la récolte est testée en laboratoire et à la cave.

Matériel et méthode

Deux types d'essais sont employés : l'essai de laboratoire sur des quantités de 200 à 500 g de vendange foulée ou de moût et l'essai en cave sur des quantités de 100 à 200 kg de vendange ou de moût.

Les méthodes d'analyse des résidus sont classiques : le dichlofluanide (matière active de l'Euparène) et son produit de dégradation : la N', N'-diméthyl-N-phényl-sulfodiamide (produit II) sont dosés selon la méthode B de VOGELER et NIESEN (1967) par chromatographie gazeuse. L'extraction, la purification et le dosage du folpet sont effectués selon le même procédé.

Résultats

Un premier essai consistait à déterminer l'influence d'un traitement tardif sur la fermentation alcoolique. On observe un retard de 3 jours pour le départ en fermentation d'une vendange de Gamay contenant à la cueillette 5 mg/kg de résidu de dichlofluanide (essais en laboratoire sur 1 kg de vendange de Gamay). La présence de résidu dans le moût produisant un retard du départ de la fermentation, l'essai suivant a consisté à étudier l'effet du nombre de traitements, appliqués de plus en plus tard, sur la fermentation par les levures; on divise une vigne en 6 parcelles dont l'une est le témoin non traité. Les autres reçoivent respectivement 1, 2, 3, 4 et 5 traitements, un tous les dix jours. La vigne n° 1 a reçu 5 traitements, le dernier en date le 13 septembre, soit moins de 1 mois avant les vendanges. La

vigne n° 3 n'en a reçu que 3, le dernier le 23 août, etc. On constate que la dose de résidu est d'autant plus grande que le nombre des traitements est plus élevé (les derniers étant appliqués très tard), le retard de la fermentation n'étant sensible que pour la vigne ayant subi les cinq traitements.

Ce problème fut repris avec le même programme de traitements en dosant 8 jours après chaque traitement le résidu sur un échantillon prélevé statistiquement à la vigne; sur la figure 1 on constate que les taux de résidus à la vendange sont d'autant plus élevés que les traitements ont été plus nombreux et plus tardifs.

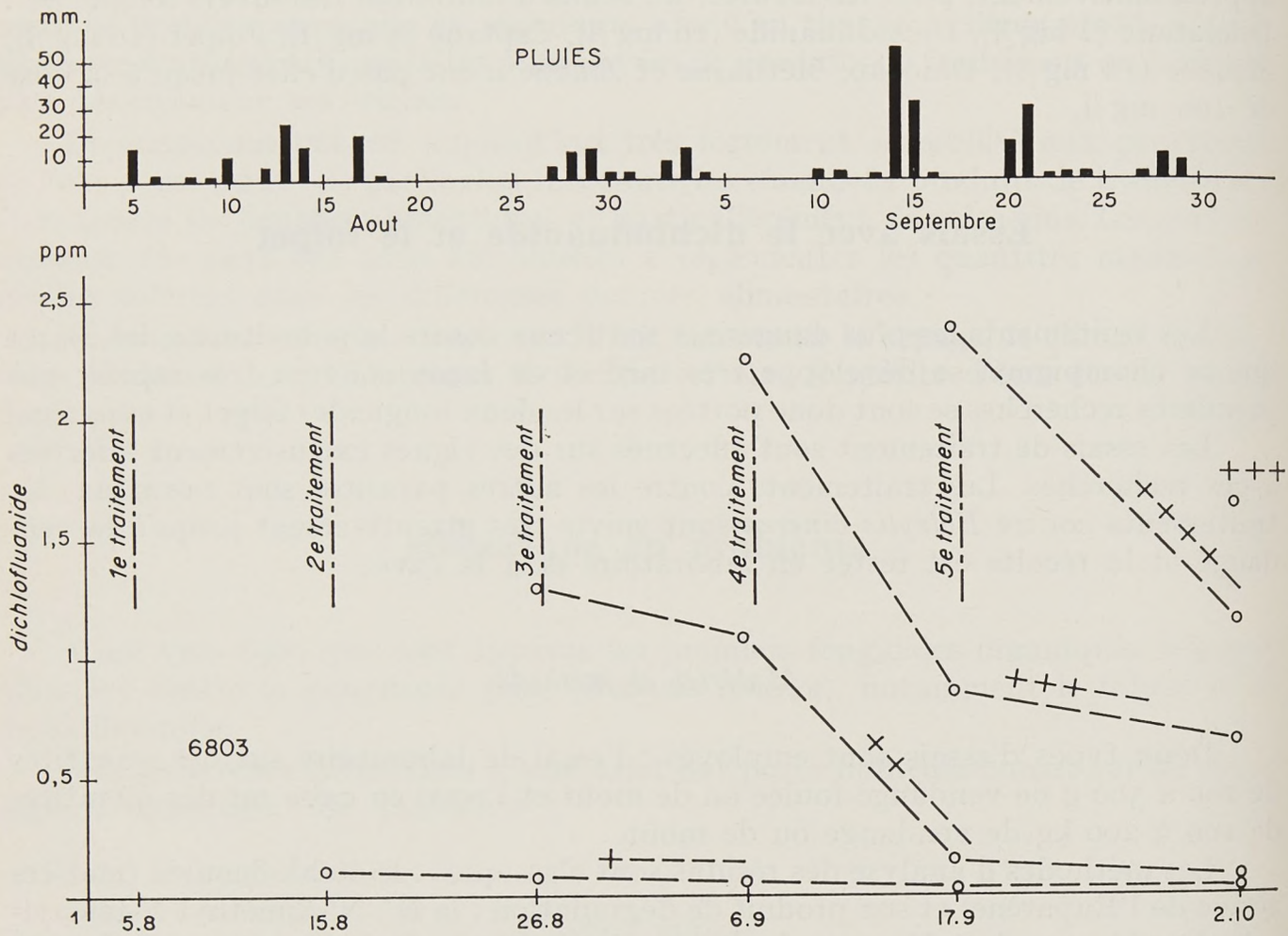


FIG. 1. — *Résidus sur les grappes en fonction du nombre de traitements de plus en plus tardifs.*

On observe, de plus, que la disparition du produit de traitement sur les grappes est due essentiellement au lessivage du raisin par les fortes chutes de pluie et non à une hydrolyse par les rayons du soleil ou la température.

Tous les essais entrepris avaient montré que les résidus de dichlofluanide et de folpet avaient un effet sur les levures et retardaient le départ de la fermentation alcoolique proportionnellement à leur teneur dans le moût au moment du levurage. Dans les essais en cave, il était souvent nécessaire de relevurer les cuves après 4 jours afin de permettre leur départ en fermentation.

Nous avons alors réalisé l'expérience suivante : dans un moût de Chasselas réparti dans 5 bonbonnes de 20 litres chacune, nous avons ajouté des doses croissantes d'Euparène (produit de traitement dont la matière active est le dichlofluanide qui représente environ 50 p. 100 mm) : 1, 4, 7 et 10 mg/l.

Après une bonne homogénéisation, nous avons levuré ces bonbonnes à raison de 1 p. 100 de culture de levure en pleine activité. L'évolution de la densité du moût

est mesurée matin et soir et un échantillon est prélevé dans chaque bonbonne à intervalles réguliers en vue du dosage chimique des produits I et II (I = dichlofluanide; II = produit de dégradation). L'extraction par l'acétone s'effectue sur l'échantillon complet, comprenant le moût et les levures en activité. Dans l'essai ayant reçu 7 mg/l d'Euparène, une seconde extraction est effectuée sur le moût après centrifugation.

La figure 2 illustre les résultats des analyses effectuées dans l'expérience avec 7 mg/l d'Euparène. On constate que la quantité de dichlofluanide dans le moût complet est plus élevée que dans le moût centrifugé, donc sans levures; par contre, la quantité de produit de dégradation (II) est rigoureusement la même dans le moût entier ou centrifugé.

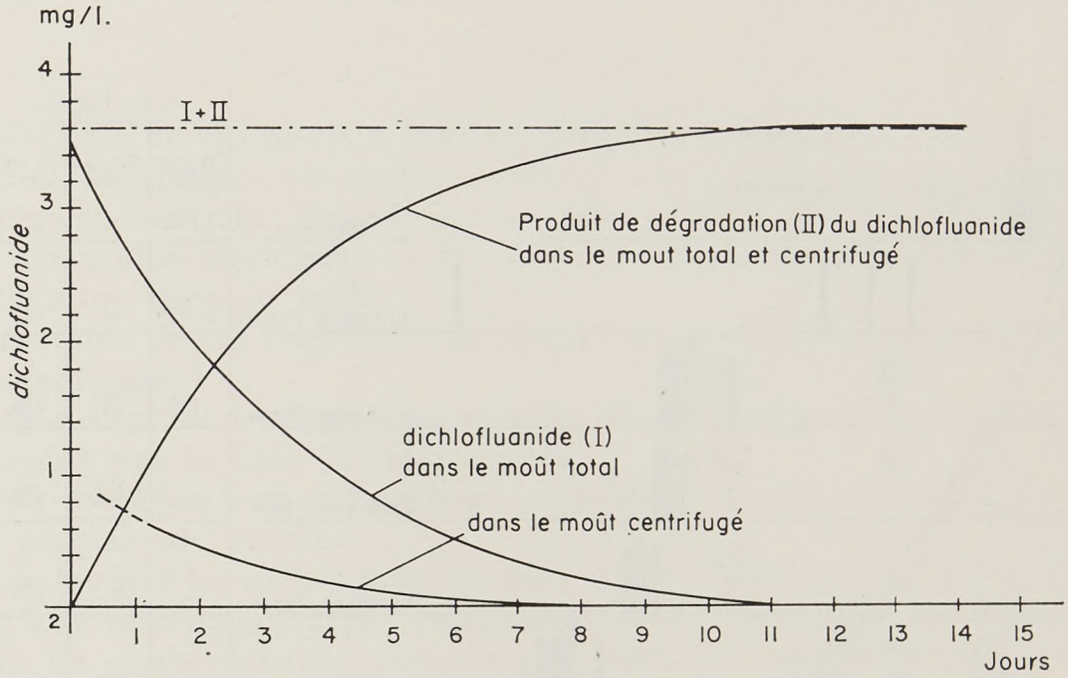


FIG. 2. — *Dégradation chimique du dichlofluanide dans un moût ayant reçu 7 mg/l d'Euparène.*

Deux hypothèses se présentent pour expliquer le comportement différent du dichlofluanide dans le moût entier ou centrifugé :

— ou bien les levures absorbent rapidement une partie du dichlofluanide, dont la dégradation pourrait avoir lieu à l'intérieur des cellules,

— ou bien le dichlofluanide, qui est très peu soluble dans les milieux aqueux, est éliminé par centrifugation.

Cette deuxième hypothèse paraît assez probable; cependant, si elle est exacte, on devrait obtenir dans le moût centrifugé une valeur constante pour le dosage du dichlofluanide, égale à la solubilité maximum de cette substance dans le moût. Le fait que l'on obtient une courbe décroissante d'allure approximativement exponentielle, elle aussi, nous porte à penser que les deux hypothèses pourraient intervenir simultanément.

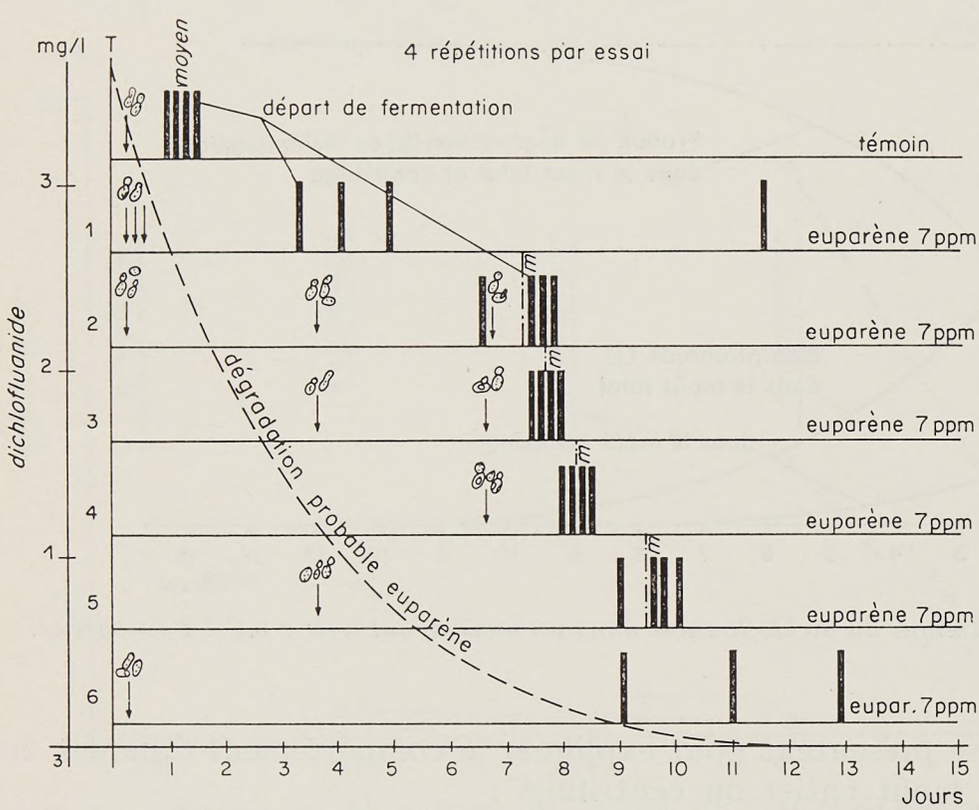
On constate ainsi que le dichlofluanide a un effet inhibiteur sur les levures; mis en contact avec le moût, il se décompose par hydrolyse et la fermentation ne peut commencer que lorsque la teneur en dichlofluanide est descendue au-dessous d'un seuil qui se situe entre 0,1 et 0,3 mg/l.

Le débourbage ou la centrifugation permettent d'éliminer une quantité appréciable du dichlofluanide encore présent dans le moût à ce moment.

Par contre, lorsque le dichlofluanide s'est décomposé (en son produit de dégradation II), celui-ci reste sous forme soluble dans le vin où il subsiste et ne peut être éliminé par des procédés techniques. Si le dichlofluanide n'est pas éliminé avant fermentation, il se décompose en totalité; nous n'avons pas mesuré la vitesse de cette décomposition en fonction du pH, de la température, etc.

Les travaux de DITTRICH (1969) ont montré que le dichlofluanide provoque la mort des cellules de levures et non pas seulement leur inhibition. Les travaux de SAPIS-DOMERCQ *et al.* (1976) et de MINARIK et RAGALA (1975) donnent des indications récentes sur la sélectivité de cette activité anti-levures.

Nous avons ensuite procédé à une expérience simple de levurages différentiels de moûts additionnés d'une dose connue d'Euparène : du moût de raisins, soigneusement homogénéisé, sulfité à 100 mg/l de SO_2 et sucré de façon à remonter sa densité à 80° Oechslé a reçu une adjonction de 7 mg/l d'Euparène commercial.



	Levurages			Retard sur tem jours
	1e jour	4e jour	7e jour	
témoin	1%	—	—	0
1 euparène 7ppm	3%	—	—	2,3,4,10
2 euparène 7ppm	1%	1%	1%	moy. 6
3 euparène 7ppm	—	1%	1%	moy. 6½
4 euparène 7ppm	—	—	1%	moy. 7
5 euparène 7ppm	—	1%	—	moy. 8½
6 eupar. 7ppm	1%	—	—	8,10,12,∞

FIG. 3. — *Essais de levurage sur des moûts de Chasselas additionnés de 7 mg/l d'Euparène.*

Puis il a été réparti dans des Erlenmeyers de 500 ml à raison de 300 ml par flacon; les différents essais (avec 4 répétitions chacun) ont été levurés selon le programme et les doses indiquées dans le tableau de la figure 3.

Cette expérience confirme les 2 notions déjà observées de destruction des levures par l'Euparène et de dégradation du dichlofluanide dans le temps.

Dans l'essai 1, malgré un levurage à 3 p. 100 le premier jour, la dose de dichlofluanide était à la limite de toxicité pour les levures : trois répétitions sont parties assez rapidement (2, 3 et 4 jours de retard), la quatrième avec 10 jours de retard. Avec 3 levurages successifs à 1 p. 100, la fermentation est partie au moment où la dose de dichlofluanide est descendue au-dessous de 0,3 mg/l (essai 2). Si le premier levurage n'est pas fait (essai 3), le départ de fermentation n'est pratiquement pas retardé; il en est de même si on ne fait qu'un seul levurage au moment où le dichlofluanide est descendu au-dessous du seuil d'inhibition. Par contre,

si on ne procède qu'à un seul levurage soit au quatrième jour (essai 5) soit au premier jour (essai 6), on constate que la vitalité des levures a été atteinte de façon moyenne au quatrième jour et de façon très marquée au premier jour (une des répétitions n'a jamais fermenté).

Nous n'avons pas effectué d'essais semblables de dégradation en fonction du temps avec le folpet. Le travail récent de N. L. WOLFE *et al.* (1976) a montré que le folpet dont la structure est très proche de celle du captane, est dégradé en solution aqueuse relativement rapidement, entre pH 2 et pH 6 par hydrolyse, indépendamment de la valeur du pH.

Cette hydrolyse fait perdre au folpet son activité antifongique; les phénomènes d'inhibition des levures par le folpet sont vraisemblablement du même type que ceux dûs au dichlofluanide.

Conclusions

L'ensemble de ces essais a montré que le dichlofluanide et le folpet peuvent subsister sur les grappes; ces résidus s'hydrolysent en milieu acide, selon une courbe à peu près exponentielle; la fermentation peut repartir lorsque la teneur en fongicide est dencendue au-dessous de 0,3 ppm, pour autant qu'il reste encore des levures vivantes dans le moût.

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à recommander aux viticulteurs et aux œnologues :

— de ne traiter les vignes qu'avec les doses de fongicides recommandées en ne dépassant pas la date limite prescrite,

— de procéder à un débourbage soigneux des moûts blancs afin d'éliminer le plus possible de résidus,

— de levurer les moûts avec un pied de cuve abondant (1 à 3 p. 100) et de procéder à un relevurage après 3 ou 4 jours en cas de non départ de la fermentation.

Dans les essais en cave, nous n'avons jamais pu mettre en évidence un effet des résidus de ces pesticides sur la fermentation malolactique.

Par contre, les effets de ces résidus sur les faux goûts des vins sont assez inquiétants; il ne s'agit pas là d'un effet primaire : le produit de dégradation II ne donne aucun faux goût. Il s'agit d'une altération de type secondaire produite par les levures dont le métabolisme est modifié par le fongicide. Ces faux goûts sont essentiellement dus à la formation d'H_2S (bocks ou mercaptans); ils se traduisent également par une amertume assez prononcée des vins. Ces faux goûts sont plus fréquents dans le cas du folpet que du dichlofluanide. Ils ne surviennent pas systématiquement, mais sont assez fréquents pour être considérés comme gênants. Le produit de dégradation d'un éventuel résidu du fongicide reste dans le vin; il n'est ni détruit ni éliminé par les opérations de vinification. A notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur la toxicité de ce produit de dégradation.

Étude de nouveaux fongicides

Cette étude sur le dichlofluanide et le folpet était à peine terminée que déjà apparaissaient de nouveaux fongicides à action systémique. Ce furent tout d'abord en 1969-70 le bénomyl et les thiophanates (de méthyle et d'éthyle) qui se transforment, après avoir pénétré dans la plante en BCM ou 2-benzimidazole-carbamate

de méthyle, ainsi que le thiabendazole, autorisés dans la plupart des vignobles, puis la dichlozoline ou 3-(3,5-dichlorphényl)-5,5-diméthyloxazolidinedione-2,4 qui fut admise provisoirement dans quelques pays, puis retirée du commerce parce que les recherches toxicologiques avaient montré qu'elle présentait un effet tératologique sur l'œil. En 1974/75, les fabricants proposent la vinclozoline (marque déposée : Ronilan) et le glycophène (marque déposée : Rovral) qui se révèlent très efficaces contre la pourriture grise (70 à 80 p. 100 d'efficacité). Ils sont tous deux dérivés de la dichloraniline.

Groupe des benzimidazoles

Nous avons repris les mêmes études que pour le folpet et le dichlofluanide sur ces nouveaux fongicides systémiques. Le bénomyl et les thiophanates se transformant en BCM (Benzimidazole-carbamate de méthyle) nous avons ajouté dans du moût de raisin des doses croissantes de BCM (agent actif contre le *Botrytis*) et de dichlozoline. Jusqu'à la dose de 10 ppm, le BCM ne provoque pas de retard significatif de la fermentation, et la dichlozoline non plus.

D'autres essais ont montré que, dans la pratique, ces résidus peuvent être plus ou moins élevés, mais dans des limites assez basses et qu'il n'a jamais été possible de constater une influence sur les levures, ni un retard dans la fermentation. Il n'y a jamais eu non plus d'effets sur la rétrogradation malolactique qui se déroule normalement.

De plus, dans tous les essais de vinification en cave, nous n'avons jamais observé de faux goûts caractéristiques pouvant être attribués directement ou indirectement aux résidus des produits systémiques.

Enfin, si le résidu dépasse la tolérance admise, il est possible d'en éliminer la plus grande partie par un traitement du vin à la bentonite : une dose de 30 g/hl peut éliminer 50 p. 100 du résidu et 100 g/hl en enlève 80 à 90 p. 100.

Malheureusement, l'utilisation de ces fongicides systémiques a suscité l'apparition de souches de *Botrytis cinerea* résistantes à leur action. Cette résistance est générale dans tous les vignobles nordiques : Allemagne, Suisse, Alsace, Bourgogne et Champagne. Ces produits y sont donc totalement abandonnés aujourd'hui.

Groupe des dérivés de la dichloraniline

Ces fongicides récents, autorisés depuis peu dans de nombreux pays viticoles sont venus prendre le relais des systémiques du groupe BCM. Ils sont très efficaces, mais aussi coûteux. On en recommande en Suisse trois traitements : le premier après la fleur, le second avant la fermeture des grappes et le dernier à fin août, c'est-à-dire dans les vignobles septentrionaux 5 à 6 semaines environ avant les vendanges.

Pour ces produits, une recherche approfondie sur leur toxicité à l'égard des levures ou des bactéries malolactiques et sur une éventuelle influence sur la formation de faux goûts dans le vin a été conduite aussi bien au laboratoire qu'à la cave. Elle a révélé que ces nouveaux fongicides n'ont eu aucune influence sur la fermentation alcoolique ni sur la fermentation malolactique, qu'ils n'inhibent pas le développement des levures et qu'ils ne provoquent l'apparition d'aucun faux goût dans le vin. Le taux des résidus diminue assez fortement dans le temps (tabl. 1).

TABLEAU I

Diminution des taux de résidus de dérivés de la dichloraniline en fonction du temps

Cépages Gamay et Pinot	Résidu en ppm	
	Vinclozoline	Glycophène
Vendange égrappée	0,75	0,65
Décuvage : vin	0,37	0,35
marcs pressés	3,89	5,19
Soutirage des lies (8 nov. 1974) : vin	0,31	0,24
lies	1,88	1,58
Vin en bouteilles	0,26	0,16

Les travaux de SAPIS-DOMERCQ *et al.* (1976) confirment ces observations : les levures *saccharomyces ellipsoideus* et *sacch. bayanus* sont beaucoup moins touchées par ces deux fongicides que par l'Euparène.

L'effet de ces produits sur la vinification est donc totalement différent de celui des fongicides folpet et dichlofluanide : aucun effet sur les fermentations alcoolique et malolactique; aucun effet sur les qualités organoleptiques. L'œnologue est informé dans le cas du dichlofluanide et du folpet, parce qu'un résidu élevé provoque un retard de fermentation, bien visible et alarmant. Un excès de vinclozoline ou de glycophène ne peut être décelé que par une analyse longue, délicate et coûteuse.

Il serait souhaitable que l'on puisse mettre au point une méthode de dosage simple, rapide, pas trop coûteuse des résidus de ces fongicides, donnant une précision suffisante pour les applications pratiques.

Conclusion

Les nouveaux fongicides organiques aussi bien le folpet et le dichlofluanide que les dérivés de la 3,5-dichloraniline se sont montrés efficaces dans la lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Il en reste souvent de très petites quantités dans la vendange au moment de la cueillette; la quantité de résidu de matière active dépend essentiellement des quantités de produits de traitement appliqués au total (dose d'application et nombre de traitements dans la saison) et de la stabilité du produit sur ou dans les grappes; elle dépend aussi de la météorologie, et en particulier, pour les fongicides de surface, des pluies survenant après la dernière application de produit. En Suisse, la teneur maximum en dichlofluanide sur le raisin est de 1 mg/kg (1 ppm), en folpet de 15 mg/kg et en BCM de 3 mg/kg. Par extension, on admet que les teneurs dans le vin doivent être inférieures ou au plus égales à ces limites.

Dans le moût, les doses de résidu sont en général plus faible que dans le raisin; une partie de la matière active reste dans les marcs de blancs; une autre partie peut être éliminée au cours de l'opération, aujourd'hui classique, du débourbage;

c'est pourquoi les résidus de fongicides sont souvent plus dangereux dans les vinifications en rouge où la totalité subsiste durant le cuvage.

Les fongicides qui subsistent dans le moût se comportent très différemment : le dichlofluanide et le folpet s'hydrolysent plus ou moins rapidement en perdant leur pouvoir d'inhibition des levures; la fermentation est tout d'abord bloquée, puis part dès que la matière active est hydrolysée, pour autant qu'il subsiste encore des levures actives dans le moût. Les fongicides vinclozoline et glycophène n'ont aucune action inhibitrice sur les levures; leur présence éventuelle dans le moût n'est donc pas signalée par un retard de fermentation, comme c'est le cas avec dichlofluanide ou folpet. C'est pourquoi il est important d'étudier très à fond les problèmes d'utilisation, de rémanence et de disparition de ces produits à la vigne; il serait utile que l'on puisse mettre au point une méthode rapide, facile et pas trop coûteuse d'analyse des résidus.

Enfin, il serait souhaitable que l'on publie des normes internationales fixant les doses maxima de résidus de ces divers fongicides dans les jus de raisins et les vins, en tenant compte de toutes les études toxicologiques déjà connues et de la consommation journalière moyenne de vin d'un adulte normal.

Summary

The remanence of fungicides and their influence

Results of research work in Switzerland on the persistance of fungicides used to combat grey rot (*Botrytis Cinerea*) are presented.

The contact fungicides, dichlofluanide and folpet, exhibit a yeast inhibiting action. Residual quantities of these two fungicides in the must prevent fermentation beginning; however, in acidic conditions these substances hydrolyse and lose their inhibiting action and fermentation will begin.

Recent fungicides, derived from (3,5-DCA) have no effect on yeasts and induce no off-flavours in the wine. It is difficult to measure their residual content in the wine which may in fact be eliminated by various treatments.

Key-words: *Vinification — Fungicides — Residuals — Action — Elimination.*

Références bibliographiques

Bolay A., Crettenand J., Gnaegi F., Schopfer J.-F., 1974. La lutte contre la pourriture grise des raisins, *Revue suisse de vitic., arboric.* et *hortic.*, **6** (3), 91-97.

Bolay A. *et al.*, 1976. Le point sur la lutte chimique contre la pourriture grise des raisins, *Rev. suisse vitic. Arboric. Hortic.*, **8** (5), 95-120.

Dittrich H. H.,, Issinger O. G., 1969. Zum Wirkungsmechanismus von Dichlofluanid, *Ztschr. für Pflanzenkrankh. und Pfl. Schutz.*, **76** (11-12), 651-663.

Dvorak V., Schopfer J.-F., 1970. Rémanence de l'Euparène et vinification, *Revue suisse de vitic. et arboric.*, **2** (5), 99-104.

Gnaegi F., Dufour A., 1972. Rémanence des fongicides anti-*Botrytis* dans les vins, *Revue suisse de vitic., arboric. et hortic.*, **4** (3), 101-106.

Gnaegi F., Lipka Z., 1974. Rémanence des fongicides systémiques dans les vins, *Revue suisse de vitic., arboric. et hortic.*, **6** (4), 117-120.

Gnaegi F., Mestres R., Tourte J., Campo M., 1974. Dosage des résidus de fongicides à noyau benzimidazole et des thiophanates, *Trav. Soc. Phram.*, Montpellier, **34**, 91-100.

LEMPERLE E., KERNER E., STRECKER H., WAIBEL A., 1973. Wirkstoffrückstande und Gärbeeinflussungen nach Anwendung von Fungiziden in Weinbau, *Dtsche Lebensmittel Rundschau*, **69** (9), 313-322.

MINARIK E., RAGALA P., 1975. Étude de l'influence des fongicides sur la microflore levurienne des raisins et des moûts en fermentation, *Mitteilungen*, **3**, 187-204.

RADLER F., SCHOENIG I., 1974. Ueber die Wirkung einiger Fungizide auf Milch säurebakterien, *Die Wein Wissenschaft*, **29** (14), 181-187.

SAPIS-DOMERCQ S., BERTRAND A., MUR F., SARRE C., 1976. Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne, *Conn. Vigne Vin*, **10** (4), 369-390.

SCHEPP H., 1974. Sind die " systemischen Fungizide " noch geeignet zur Bekämpfung der Grauf äule im Rebbau, *Schw. Zeitschrift für Obst-und Weinbau*, **110**, 330-332.

STRINGER A., WRIGHT M. A., 1973. The effect of benomyl and some related compounds on Lumbricus terrestris and other earthworms, *Pestic. Sci.*, **4**, 165-170.

SYPESTEIJN A., Kaars, VAN DER KERK G. J. M., 1969. Biochemical modes of action of fungicides, *Proc. 5th Br. Insectic. Fungic. Conf.*

VOGELER K., NIESEN H., 1967. Détermination par colorimétrie et chromatographie en phase gazeuse des résidus dans les plantes après application d'Eurapène, *Pflanzensch. Nachricht. Bayer.*, **20**, 534-549.

WOLFE N. L., ZEPP R. G., DOSTER J.-C., HOLLIS R. C., 1976. Captan Hydrolysis, *J. Agric. Food Chem.*, **24** (5), 1041-1045.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 395-397

INTERVENTION

Résidus de 2 imidazolidine thione dans les moûts et les vins

O. COLAGRANDE et V. MAZZOLENI

Institut d'Oenologie,
Université Catholique du Sacré-Cœur,
Piacenza (Italie)

La contamination du raisin et du vin par des résidus de produits antiparasitaires, ou leurs métabolites, pose un problème qui ne peut être négligé. Ces résidus ont souvent un caractère toxique qui se manifeste quand ils sont ingérés à petites doses pendant longtemps, étant donnée la possibilité d'accumulation dans l'organisme humain.

Nous voudrions attirer l'attention sur l'éthylthio-urée (2 imidazolidine thione) qui est un des produits de décomposition des éthylène-bis-dithiol-carbamates (zineb, maneb, nabam, mancozeb) largement employés comme anticryptogames pour la défense de la vigne.

En réalité, ni les principes actifs, ni leurs métabolites n'ont un caractère toxique aigu, mais certains effets néfastes de ce groupe de composés (possibilité d'irritation de la peau et des yeux) sont connus depuis longtemps.

En ce qui concerne l'éthylthio-urée (ETU), de récentes notes bibliographiques indiquent que celle-ci est cancérigène et provoque des altérations des glandes thyroïdiennes.

L'ETU est normalement contenue dans les produits commerciaux des éthylène-bis-dithiol-carbamates; d'autre part plusieurs auteurs soulignent que les résidus des éthylène-bis-dithiol-carbamates qui restent sur les feuilles et sur les autres organes des plantes traitées sont d'excellents précurseurs de l'ETU qui peut être absorbée et transportée par voie phloématique.

Des résidus de ETU ont été trouvés dans des produits fruitiers et maraîchers (de 0,01 à 0,03 mg/kg). Il a également été constaté que les végétaux (par exemple des tomates) contenant des résidus d'éthylène-bis-dithiol-carmabate s'enrichissent en ETU après cuisson.

Les études sur la présence et la transformation de l'ETU dans le vin sont rares.

Pourtant, toutes les conditions sont requises pour qu'il existe des résidus d'ETU dans le vin. Ces résidus peuvent dériver de la transformation des éthylène-bis-dithiol-carbamates présents sur la pellicule des grains lors du pressurage surtout dans les régions où l'on a fréquemment recours aux traitements anticryptogames tardifs et où est pratiquée la vinification par macération. Une autre source éventuelle de ETU est son passage à caractère essentiellement systémique, des feuilles à la grappe et aux grains.

Il faut rappeler à ce propos que l'ETU est hydrosoluble et qu'elle peut donc être transférée, probablement avec les produits photosynthétiques, des feuilles aux fruits par voie phloématique.

Pour la recherche de l'ETU dans le vin, nous avons utilisé un procédé mis au point dans notre laboratoire basé sur l'extraction de l'ETU par un mélange d'alcool éthylique et de tétrachlorure de carbone. Nous faisons réagir l'ETU avec chlorure de m-trifluorométhyl benzyle et le composé formé est dosé par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à capture d'électrons. Nous avons dosé l'ETU sur des échantillons de moût et de vin. Les résultats montrent que les moûts et les vins examinés contiennent de petites quantités d'ETU (tabl. 1).

TABLEAU 1

Résidus de ETU (mg/l) dans moûts et vins

Moûts	Résidus	Vins	Résidus
Malvasia	0,55	Malvasia	2,00
Barbera	0,76	Malvasia	1,80
Bonarda	0,55	Malvasia	3,00
Pinot	0,80	Riesling	0,71
		Gutturnio	traces
		Gutturnio	2,80
		Gutturnio	1,00
		Gutturnio	1,84
		Valpolicella	0,80
		Sassella	2,27

TABLEAU 2

Teneurs en éthylthio-urée des vins conservés

Échantillons	Vins	Vin traité avec 100 g/hl de bentonite	Vin après 6 mois
1	0,71	0,12 (— 83 %)	0,32 (— 54 %)
2	0,80	0,33 (— 58 %)	0,36 (— 55 %)
3	1,84	0,55 (— 70 %)	0,57 (— 69 %)
4	2,27	1,43 (— 37 %)	1,01 (— 55 %)

Dans les vins conservés pendant six mois (tabl. 2), de fortes diminutions de la teneur en ETU ont été observées. Après avoir ajouté à un moût des doses de 5 et 10 g/hl de Zineb, nous avons trouvé, dans les vins correspondants respectivement 4,8 et 6,0 mg/l d'ETU; ceci nous permet de supposer une probable formation d'ETU à partir du Zineb pendant le processus de fermentation.

Les essais que nous avons réalisés étant limités il serait bon d'approfondir les recherches pour établir plus exactement la présence et le destin de l'ETU dans les vins.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 399-409

Le gaz carbonique dans les vins tranquilles son incidence organoleptique

P. RIBÉREAU-GAYON et Mme A. LONVAUD-FUNEL

Institut d'Oenologie
Université de Bordeaux II (France)

Résumé

Il existe actuellement plusieurs méthodes permettant une détermination satisfaisante du gaz carbonique dans le vin. La teneur de ce gaz dans les vins nouveaux est limitée par son coefficient de solubilité (environ 1,5 g/l). La conservation en cuve se différencie de la conservation en fût par l'absence de dégazage spontané; des dispositions particulières (soutirage à l'air, dégazage par l'azote) doivent alors être prises pour obtenir le réglage approprié au moment de la mise en bouteilles.

La conservation sous gaz inerte (CO_2 ou N_2) risque, en l'absence de certaines précautions, de modifier d'une manière inacceptable la teneur en gaz carbonique. Cependant, utilisée à bon escient, elle constitue un procédé simple et rigoureux de réglage du taux de CO_2.

Sur le plan organoleptique, CO_2 participe aux caractères des vins même en dessous de la dose minimum de perception par son pétillement caractéristique (600 mg/l). La dose optimum varie dans des limites assez larges, en fonction du type de vin. Il est important de veiller au respect de ces doses optima; actuellement, le réglage du gaz carbonique est beaucoup trop irrégulier; des progrès substantiels doivent être faits dans ce domaine important de l'œnologie.

Mots clés : *Vin - CO_2 - Dosage - Technologie - Rôle organoleptique.*

Introduction

Le gaz carbonique est, par sa formule même, un des constituants chimiques les plus simples contenus dans le vin. On lui connaît d'autre part une incidence organoleptique non négligeable. Pour ces raisons, on peut être surpris de l'intérêt limité auquel il a donné lieu, autant au niveau de la recherche œnologique que de la définition des techniques de travail du vin. Il existe probablement plusieurs explications : 1) il s'agit d'un gaz et son dosage fait appel à des techniques de laboratoire différentes de celles utilisées pour l'analyse des solutions avec lesquelles les œnologues sont plus familiarisés; 2) des pertes de gaz carbonique non négligea-

bles au cours des manipulations, en particulier entre le prélèvement d'un échantillon et son dosage, rendent difficile l'appréciation de la validité des résultats analytiques et l'établissement d'une relation entre la teneur en gaz carbonique et les caractères organoleptiques; 3) avec les méthodes traditionnelles de garde prolongée des vins en fûts de bois de petite capacité, les pertes sont généralement importantes et les vins arrivent le plus souvent à la mise en bouteilles avec des doses faibles et constantes de gaz carbonique lequel n'est donc pas un problème technologique. Mais il n'en est plus de même lors de la conservation dans des cuves en ciment ou en métal, avec lesquelles les pertes de gaz carbonique sont faibles et irrégulières.

Encore aujourd'hui, un nombre limité seulement d'entreprises vinicoles effectue un contrôle systématique de ce gaz, contrôle qui serait pourtant une opération du plus grand intérêt (BARBET et IRRMANN, 1972; MÜLLER-SPAETH, 1973; SIEGRIST, 1976). Sur le plan de la recherche, les travaux de JAULMES (1973) font autorité; cependant une étude exhaustive des différents aspects du problème du gaz carbonique dans les vins restait à faire, il a fait l'objet de la thèse de l'un des auteurs (LONVAUD FUNEL, 1976) et de différentes applications (RIBÉREAU-GAYON et LONVAUD-FUNEL, 1976; LONVAUD-FUNEL et RIBÉREAU-GAYON, 1976 et 1977).

Méthodes de dosage

Méthode utilisant une électrode spécifique

L'appareillage est essentiellement constitué par une électrode de verre au contact d'une solution de bicarbonate, elle-même séparée du liquide à analyser (mélange vin et eau) par une membrane de téflon; l'ensemble est placé dans un bain thermostaté afin d'opérer à température constante. Au cours de la mesure, le CO_2 diffuse à travers la membrane et modifie le pH de la solution de bicarbonate. La variation de pH est mesurée par l'électrode de verre; elle est proportionnelle au logarithme de la pression partielle (pCO_2) du gaz carbonique dans le milieu; à partir de pCO_2 on calcule la concentration en g /l. Un enregistrement automatique simplifie la manipulation; un étalonnage préalable est effectué avec des mélanges gazeux d'azote et de gaz carbonique.

La précision des résultats dépend beaucoup de la membrane de téflon qui assure la diffusion du CO_2. Avec une membrane neuve la précision est de l'ordre de 1 p. 100; elle passe de 5 à 7 p. 100 après 4 à 6 semaines d'utilisation. Il est donc recommandé de la changer toutes les quatre semaines.

Les différents contrôles effectués ont montré que cette électrode spécifique constitue une véritable méthode de référence pour le dosage du gaz carbonique dans les vins; elle est rapide, précise et simple. En outre la mesure est directe, sans référence à un échantillon dégazé; elle ne nécessite aucune préparation préalable de l'échantillon. Un autre avantage est la possibilité de doser le CO_2 dans des vins relativement pauvres (de l'ordre de 100 mg /l) dans lesquels cependant ce gaz a une incidence organoleptique non négligeable (cas des vins rouges de Bordeaux par exemple).

Bien sûr son principal inconvénient est la nécessité d'un matériel complexe et onéreux; son emploi est forcément limité aux laboratoires spécialisés.

Méthodes de routine

Une conclusion importante du travail de Mme LONVAUD-FUNEL est la nécessité d'un contrôle systématique du CO_2 dans tous les vins avant leur mise en bouteilles. Une méthode de dosage applicable dans les laboratoires les plus modestes est nécessaire; l'électrode de référence a permis de tester les trois principales d'entre elles.

La méthode « Van Slyke » consiste à extraire sous vide le gaz d'une prise d'essai de vin; la mesure de son volume donne la teneur en gaz carbonique. Cette méthode fournit des résultats satisfaisants pour des vins relativement riches en CO_2 (teneur supérieure à 400 mg/l). La manipulation de l'appareil est simple, mais il utilise du mercure dont les vapeurs sont dangereuses; en outre l'étanchéité au vide n'est pas toujours facile à contrôler.

La méthode « Jaulmes » consiste à agiter une prise d'essai de vin dans un flacon de capacité largement supérieure. Le gaz carbonique se répartit entre la phase gazeuse et la phase liquide, en fonction de son coefficient de solubilité. On mesure, à volume et température constants, l'augmentation de pression qui est proportionnelle à la teneur en gaz carbonique du vin. L'appareil est simple et sa manipulation aisée; avec certaines précautions opératoires, cette méthode donne des résultats satisfaisants même pour des vins pauvres en CO_2 (moins de 400 mg/l); un avantage certain est la possibilité de mise en œuvre dans un laboratoire sommairement équipé, éventuellement même dans un chai.

Les méthodes titrimétriques consistent à titrer une fonction acide du gaz carbonique entre deux pH correctement choisis; l'interférence des autres acides du vin est éliminée en effectuant successivement un titrage sur le vin nature et un titrage sur le vin dégazé. Sur ce même principe il existe plusieurs méthodes comportant différentes causes d'erreurs; leur étude critique a permis à Mme LONVAUD-FUNEL de proposer le meilleur mode opératoire qui donne des résultats satisfaisants, en nécessitant uniquement un pH mètre, appareil largement répandu dans tous les laboratoires d'analyse des vins.

On peut ajouter que la première méthode de routine nécessite seulement une prise d'essai de 1 à 2 ml de vin alors que les deux autres mettent en œuvre 50 ml.

En tout cas, il existe plusieurs méthodes, nécessitant un appareillage simple, susceptibles de doser le gaz carbonique dans les vins avec une bonne précision. Il est indispensable que leur usage se développe, compte tenu de l'importance organoleptique de ce constituant du vin.

Origine et évolution au cours de la conservation

Les processus biochimiques de formation

Bien sûr, la transformation du sucre en alcool par la levure constitue l'origine essentielle du gaz carbonique du vin; il s'en forme ainsi plus de 80 g/l dont l'essentiel se dégage puisque la solubilité dans le vin est limitée aux environs de 1,5 g/l.

Mais d'autres processus de décarboxylation interviennent, pendant la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique, également au cours de la conservation et du vieillissement. Connaissant la concentration moyenne des

constituants dégradés, on peut calculer approximativement, à partir des équations correspondantes, les quantités de gaz carbonique susceptibles d'être formées (LONVAUD-FUNEL, 1976). Dans l'ensemble ces formations sont limitées. Mais la production de ce gaz par la fermentation malolactique (de l'ordre de 1,5 g/l) ne peut pas être négligée; si cette fermentation secondaire se produit plusieurs mois après la fermentation principale, elle est susceptible de ramener à la saturation un vin qui avait perdu la quasi-totalité du gaz formé par la fermentation alcoolique.

Les quantités de CO_2 libérées par les décarboxylations chimiques du vieillissement sont faibles (inférieures à 0,1 mg/l) il est peu vraisemblable qu'elles soient responsables des teneurs élevées observées dans certains vins vieux en bouteilles dont l'origine est probablement un phénomène fermentaire.

Solubilité

Le coefficient de solubilité du CO_2 dans le vin dépend de plusieurs facteurs : la pression, la composition du vin (titre alcoométrique et substance dissoute), la température.

En ce qui concerne la composition du milieu, le coefficient de solubilité diminue avec le titre alcoométrique entre 10 et 14 °GL et avec la teneur en sucre (Tabl. 1);

TABLEAU 1

Coefficient de solubilité du CO_2 à 0 °C, sous 760 mm de Hg en fonction de la composition du vin
Les chiffres sont exprimés en litre de CO_2 par litre de vin

Taux de sucre (g/l)	Titre alcoométrique				
	10°	11°	12°	13°	14°
0	1,577	1,565	1,552	1,539	1,527
40	1,502	1,490	1,477	1,464	1,452
80	1,402	1,390	1,377	1,364	1,352

probablement d'autres constituants du vin interviennent également (colloïdes, protéines, extraits...).

La solubilité est directement proportionnelle à la pression; dans le cas des vins tranquilles, qui nous intéresse ici, il ne s'agit pas d'un facteur essentiel. Mais c'est la température qui constitue la cause principale de modification de la solubilité du gaz carbonique dans le vin. Les tables d'Agabaliantz donnent les coefficients, b et c, qui permettent de calculer la solubilité B à t °C en fonction de celle à 0 °C, Bo, à l'aide de la relation :

$$B = Bo - bt + ct^2$$

Un exemple de variation du coefficient de solubilité en fonction de la température est donné par le tableau 2. MÜLLER-SPAETH (1973) a tracé des courbes qui

TABLEAU 2

Coefficients de solubilité du gaz carbonique dans les vins secs en fonction de la température (sous une pression de 760 mm de Hg)

Température	Vin de 10° d'alcool		Vin de 12° d'alcool	
	CO_2 (l/l)	CO_2 (g/l)	CO_2 (l/l)	CO_2 (g/l)
0 °C	1,577	3,118	1,552	3,068
15 °C	0,917	1,812	0,897	1,773
30 °C	0,545	1,077	0,538	1,064

donnent des valeurs approchées de la solubilité du gaz carbonique dans le vin en fonction de la température et de la pression.

D'après ces résultats, aussitôt après l'achèvement des phénomènes fermentaires, le vin nouveau devrait contenir, à 20 °C et sous la pression normale, environ 1,5 g/l de CO_2; cependant quelques déterminations effectuées à ce stade de la vinification donnent des valeurs voisines de 2 g/l, sans dégagement gazeux visible; tout semble se passer comme si un phénomène de sursaturation existait dans le vin.

Évolution au cours de la garde en fûts et en cuves

Bien entendu une telle étude suppose d'abord des précautions particulières pour éviter les pertes au moment de la prise d'échantillons; la meilleure solution consiste à prélever par siphonnage avec arrivée du liquide au fond du flacon.

Différentes observations ont montré, au cours de la conservation en fûts, des pertes de 6 à 8 p. 100 par mois, en fonction de la teneur initiale et de la température; ces pertes sont moins importantes lorsque les fûts sont placés dans la position dite « bonde de côté ». Mais il s'agit de pertes par évaporation, indépendantes du dégazage éventuel que peuvent provoquer les pompages, soutirages et autres manipulations du vin. Ainsi à l'issue d'une ou deux années de garde, on arrive le plus souvent à des doses faibles et constantes de gaz carbonique.

Par contre, des vins conservés six mois en cuves, toujours sans soutirage, contenaient encore de 1,0 à 1,4 g/l de CO_2, traduisant des pertes faibles; le dégazage est alors sous la dépendance exclusive des soutirages. Mais les pertes de gaz carbonique lors des soutirages sont très variables, en fonction de la teneur initiale en CO_2, de la température et aussi des conditions d'aération; lors du soutirage d'un vin à 8 °C, par pompage de cuve à cuve et refoulement par le bas de la cuve à remplir, la perte de CO_2 a été de 2,5 p. 100; par contre lors du soutirage d'un vin à 20 °C avec une forte aération, la perte a atteint 40 p. 100. Le dégazage peut également être conduit avec des dispositifs spéciaux comportant une insufflation d'azote (Barbet et Irrmann, 1972; Siegrist, 1976).

On comprend bien comment, en l'absence de précautions particulières, les vins élevés intégralement en cuves peuvent arriver au moment de la mise en bouteilles avec des doses variables de gaz carbonique qui peuvent être, selon les cas, trop élevées ou trop faibles. On explique aussi comment les questions relatives

au gaz carbonique des vins tranquilles sont devenues, en bordelais, un problème d'actualité de l'œnologie dans un passé récent, correspondant à la généralisation de la garde en cuve.

Incidence de la mise en bouteilles

La mise en bouteilles est une manipulation du vin parmi les plus susceptibles d'influer sur le taux de gaz carbonique du vin. MÜLLER-SPAETH (1973) indique des modifications qui peuvent être sensibles en fonction du système de tirage. Par contre, pour Mme LONVAUD-FUNEL (1976), dans le cas des vins tranquilles, tous les systèmes de tirage conduisent au même résultat; seules les techniques de mise en bouteilles à chaud entraînent des pertes sensibles, dont il faut éventuellement savoir tenir compte.

Modification de la teneur en gaz carbonique au cours de la conservation sous gaz inerte

Afin d'éviter les contaminations, par les microorganismes aérobies, des vins conservés en cuves incomplètement pleines, on a proposé (JAULMES, 1973) de les placer sous une atmosphère de gaz inerte (CO_2 ou N_2). Mais il est bien évident que les phénomènes d'échange entre la phase gazeuse et la phase liquide sont susceptibles, avec le premier gaz d'enrichir le vin exagérément, avec le second de le dégazer excessivement. Une étude théorique et expérimentale de ce phénomène a conduit Mme LONVAUD-FUNEL aux résultats du tableau 3; bien entendu la variation de CO_2 dépend étroitement du niveau de remplissage de la cuve; elle est encore plus importante si l'atmosphère de gaz inerte est renouvelée en permanence par un balayage. L'équilibre est assez rapidement atteint; le temps nécessaire dépend des volumes et varie entre quelques heures en petits récipients au laboratoire et quelques jours dans la pratique des chais.

TABLEAU 3

Variation de la teneur en CO_2 (en p. 100 de la teneur initiale) dans le cas de conservation sous CO_2 pur ou N_2 pur, en fonction du remplissage du récipient

(t = 13 °C; CO_2 initiale = 285 mg/l)

Pourcentage de remplissage de la cuve	Pourcentage de variation de la teneur initiale en CO_2 du vin	
	Conservation sous	
	CO_2 pur	N_2 pur
98,5	+ 1,2	— 1
82,2	+ 112	— 20
50,4	+ 290	— 55
18,0	+ 506	— 89

En tout cas, les chiffres du tableau 3 montrent bien que la conservation sous gaz pur n'est pas toujours compatible avec le respect de la teneur idéale en gaz carbonique. En particulier l'emploi d'azote pur est acceptable uniquement pour la conservation de vins relativement pauvres en CO_2 et en cuves pratiquement pleines.

Il était donc important d'effectuer une étude théorique susceptible de prévoir, dans chaque cas, le mélange de CO_2 et N_2 nécessaire pour ne pas apporter de modification de la teneur en CO_2 du vin, quel que soit le remplissage de la cuve.

D'après la loi de Dalton, lorsqu'un vin est conservé au contact d'une atmosphère de $CO_2 + N_2$, le gaz carbonique se répartit entre les deux phases jusqu'à

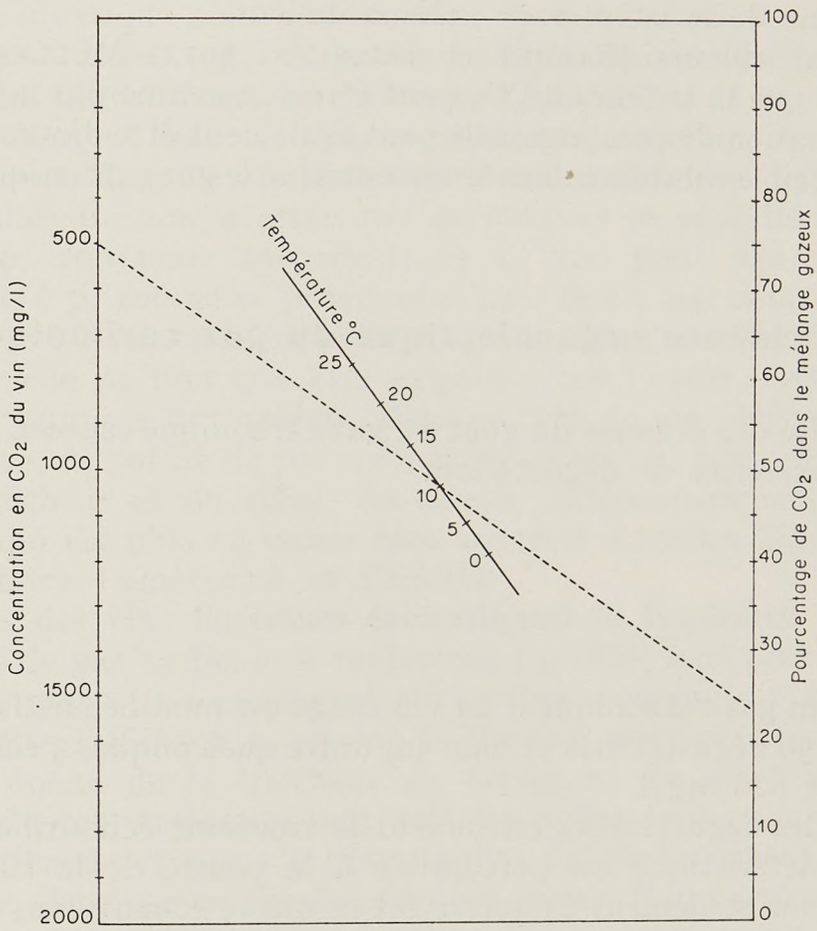


FIG. 1. — *Abaque donnant la composition du mélange gazeux à utiliser pour conserver au vin sa concentration initiale en CO_2* (P = 1 atm.)

l'équilibre des pressions partielles. Sur ce principe, des calculs effectués par Mme LONVAUD-FUNEL et confirmés expérimentalement, ont conduit à la formule donnant, pour une pression de l'atmosphère, le pourcentage (a) en CO_2 du mélange à utiliser pour maintenir la concentration initiale (q) en CO_2 du vin.

$$a\ (\%) = 0{,}0506 . \frac{q}{\alpha}$$

α = coefficient de solubilité du CO_2 dans le vin (ml/ml) (Tabl. 1 et 2).

Cette formule a permis de tracer une abaque (fig. 1) qui donne très simplement, en fonction de la température, la composition du mélange gazeux permettant de ne pas modifier le taux de CO_2, quel que soit ce taux.

Sous une surpression de p mm Hg on a :

$$a' = a . \frac{760}{760 + p}$$

D'autre part, on a également établi la formule permettant de faire varier, dans des proportions souhaitées, la concentration en CO_2 d'un vin; k étant le coefficient de multiplication souhaité du taux initial de CO_2, la composition en CO_2 du mélange ($CO_2 + N_2$) est donnée par :

$$a\,(\%) = q . \frac{13{,}73\,k}{T . \alpha} + \frac{(k - 1)v}{10(V - v)1{,}977}$$

V = volume de la cuve; v = volume du vin.

On sait par ailleurs (BARBET et IRRMANN, 1972; MÜLLER-SPAETH, 1973; SIEGRIST, 1976) que la teneur en CO_2 peut être augmentée par injection de ce gaz dans une canalisation de pompage; elle peut également être diminuée par injection d'azote dont la faible solubilité dans le vin entraîne le gaz carbonique qu'il contient.

Incidence organoleptique du gaz carbonique

La sensibilité des organes du goût au gaz carbonique est bien mise en évidence par différents exercices de dégustation.

Cas des vins rouges

La teneur en gaz carbonique d'un vin rouge est modifiée de façon à présenter, à un groupe de 50 dégustateurs et dans un ordre quelconque, 3 échantillons contenant 20, 360 et 620 mg/l.

73 p. 100 des dégustateurs retrouvent le troisième échantillon dans lequel le picotement caractéristique est perceptible à la pointe de la langue.

53 p. 100, non seulement caractérisent ce même échantillon, mais encore font la distinction entre les deux premiers, alors que le caractère propre du gaz carbonique n'est pas perceptible.

Pour bien montrer cette sensibilité des dégustateurs au gaz carbonique des vins rouges, on peut faire une comparaison avec la sensibilité au goût acide. Dans un autre exercice, on a proposé aux mêmes dégustateurs de classer trois échantillons correspondant à un vin rouge dans lequel l'acidité a été modifiée (3,3; 3,8 et 4,5 g/l); il s'agit pour les vins rouges, d'une variation d'acidité relativement importante. Pourtant 38 p. 100 des dégustateurs (au lieu de 27 p. 100 dans l'exercice précédent) ne donnent aucune réponse juste; 32 p. 100 seulement (au lieu de 53 p. 100) donnent une réponse entièrement correcte.

Il était important également de préciser les préférences des dégustateurs à l'égard du gaz carbonique. Au même groupe on présente, toujours de façon anonyme, deux échantillons correspondant au même vin, mais contenant 30 et 300 mg/l de gaz carbonique; 65 p. 100 préfèrent le plus pauvre en CO_2 et 31 p. 100 celui qui en contient 300 mg/l; les autres dégustateurs sont sans opinion.

On remarque que ce gaz, même en dessous de la dose à laquelle il est percep-

tible par son picotement à la pointe de la langue (500 à 600 mg/l), renforce le caractère tanique des vins rouges; il diminue la souplesse. Cependant à des doses trop faibles, il peut rendre le vin un peu fade. Les données dont on dispose à l'heure actuelle semblent indiquer que les meilleures doses de gaz carbonique, pour les grands vins rouges de Bordeaux destinés au vieillissement, se situent entre 100 et 200 mg/l, en tout cas ne devraient pas dépasser 300 mg/l. Ces valeurs doivent être augmentées pour les vins moins taniques et consommés en primeur qui peuvent contenir jusqu'à 0,5 g/l de CO_2; à la limite les vins rosés peuvent avoir autant de gaz carbonique que des vins blancs secs.

Cas des vins blancs

Un exercice identique a été réalisé, dans des conditions semblables, avec des doses de 250, 730 et 1 100 mg/l de gaz carbonique dans un même vin blanc sec.

98 p. 100 des dégustateurs caractérisent l'échantillon le plus riche.

92 p. 100 donnent une réponse entièrement correcte.

Par conséquent, dans ce cas également, on constate une remarquable sensibilité des dégustateurs non avertis. Les préférences se répartissent de la façon suivante : 25 p. 100 pour 250 mg/l; 67 p. 100 pour 730 mg/l; 2 p. 100 pour 1 100 mg/l; 6 p. 100 ne se prononcent pas. Donc, par comparaison avec les vins rouges, les vins blancs secs supportent une dose de gaz carbonique plus élevée; mais cependant elle ne doit pas être exagérée, car l'excès n'est pas aussi bien accepté qu'on le suppose quelquefois. Dans ce type de vin, une certaine quantité de gaz carbonique, de l'ordre de 700 mg/l et même un peu plus augmente l'arôme, donne de la fraîcheur et du relief. Au-dessus, indépendamment du pétillement caractéristique qui est plus ou moins bien apprécié selon les dégustateurs, le gaz carbonique renforce l'amertume et l'acidité.

Dans le cas des vins liquoreux de la région de Bordeaux (Sauternes), des doses excessives de gaz carbonique renforcent l'acidité, font perdre les sensations d'onctuosité, de gras et de moelleux; si l'on donne la priorité à ces caractères, la teneur doit être inférieure à 300 mg/l. Mais on peut préférer aussi une dose supérieure qui donne de la fraîcheur au détriment du moelleux.

Bien entendu ces remarques sont valables avant tout pour les vins de Bordeaux; en fonction des types, de l'éventualité du vieillissement, des conditions de la dégustation, les doses optimales peuvent varier. Il appartient donc à chaque région viticole de définir les teneurs en gaz carbonique les mieux adaptées à leurs productions et ensuite de mettre en œuvre les conditions nécessaires pour les respecter. La fixation de ces normes ne nécessite cependant pas une aussi grande rigueur que pour d'autres constituants; en effet la teneur en gaz carbonique est relativement variable et, dans le verre de dégustation, les pertes peuvent atteindre 30 p. 100 au bout de cinq minutes.

Teneur en gaz carbonique des vins de Bordeaux prêts à la consommation

Ayant défini l'incidence du gaz carbonique sur les caractères organoleptiques, il était intéressant d'effectuer un contrôle dans des vins en bouteilles prêts à la consommation.

On a analysé 129 échantillons de vins rouges, blancs secs et blancs liquoreux,

élaborés dans différentes régions viticoles bordelaises; ils ont été mis en bouteilles soit à la propriété, soit dans les chais des négociants; parmi ceux-ci 95 échantillons sont millésimés et 75 d'entre eux proviennent des récoltes comprises entre 1970 et 1974. La discussion des résultats conduit aux conclusions suivantes, tenant compte des observations précédentes concernant le rôle du gaz carbonique sur les caractères organoleptiques :

1° Dans le cas des vins rouges, l'échelle des teneurs est très large puisqu'elle va de presque 0 à près de 1 000 mg/l. 25 échantillons sur 83, soit 30 p. 100 sont trop riches en gaz carbonique puisqu'ils en contiennent plus de 300 mg/l.

2° Dans les vins blancs secs (27 échantillons) également, l'échelle des teneurs est très large; elle va de moins de 100 mg/l jusqu'aux environs de 1 400 mg/l. Mais dans ce cas, un nombre important d'échantillons est trop pauvre en gaz carbonique. Finalement quelques 20 p. 100 seulement sont bien réglés et contiennent de 500 à 850 mg/l.

3° La majorité des vins blancs liquoreux (19 échantillons) est pauvre en gaz carbonique; la quasi-totalité en contient moins de 200 mg/l. On peut expliquer ce résultat par la solubilité plus faible de ce gaz en présence de sucre. Dans ce cas, les teneurs observées sont plus conformes aux nécessités organoleptiques.

Conclusion

Le taux de gaz carbonique est un élément important de la qualité des vins; même en-dessous de la limite de perception, il participe aux caractères organoleptiques. La dose optimum dépend du type de vin. Le contrôle analytique de ce gaz est une nécessité.

Si la conservation du vin est faite sans tenir compte de cet élément, la mise en bouteilles n'est pas toujours réalisée dans les conditions les meilleures. Une telle circonstance est actuellement fréquente.

Il est donc indispensable de développer les techniques de chai qui permettent le réglage de ce constituant. La technologie doit accomplir d'importants progrès dans ce domaine.

Summary

Carbon dioxide in wine and its organoleptic incidence

Several methods are known to give satisfactory determinations of carbon dioxide in wines. The level of this gas in young wines is limited by its solubility coefficient (about 1,5 g per liter). There are differences between storage in vats and storage in casks concerning the absence of spontaneous degasification; special conditions (air drawing off, degasification with nitrogen) have to be kept to obtain a correct regulation when bottling.

Storage under an inert gas (CO_2 or N_2) without special precautions may induce non acceptable changes in carbon dioxide level. However, when used correctly, it is a simple, accurate regulating process of CO_2 level.

Concerning organoleptic properties, CO_2 contributes to wine character, even under the minimum level of perception, by its typical sparkling (600 mg per liter). The optimum level can be varied within wide limits, according to the type of wine. It is important to respect these optima levels. At present, carbon dioxide regulation is too irregular. Progress must be made in this important part of enology.

Key-words: *Wine — CO_2 — Regulation — Technology — Organoleptic importance.*

Références bibliographiques

BARBET J., IRRMANN R., 1972. *IIIe Symposium International d'Oenologie*, Le Cap (Afrique du Sud).

JAULMES P., 1973. *Colloque International d'Œnologie* (I.T.V.), Arc et Senans.

LONVAUD-FUNEL A., 1976. *Recherche sur le gaz carbonique des vins*, Thèse 3e Cycle, Bordeaux.

LONVAUD-FUNEL A., RIBÉREAU-GAYON P., 1976. *Conn. Vigne Vin*, **10** (4), 391-407.

LONVAUD-FUNEL A., RIBÉREAU-GAYON P., 1977. *Conn. Vigne Vin*, **11** (1), 73-91.

MÜLLER-SPAETH H., 1973. *Seitz Werke Gmbh*, D. 6550, Bad-Kreuznach.

RIBÉREAU-GAYON P., LONVAUD FUNEL A., 1976. *C. R. Acad. Agric.*, **62**, 491.

SIEGRIST M. S., 1976. *Rev. Franç. Oenologie*, **62**, 45.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 411-419

Application de la chromatographie en phase gazeuse au contrôle analytique des vins

A. D. WEBB

Department of Viticulture and Enology
University of California, Davis (California)

Résumé

La chromatographie en phase gazeuse, technique analytique développée ces 25 dernières années, est basée sur la séparation des substances d'un mélange organique par partage entre une phase liquide et une phase gazeuse en équilibre.

Des modifications de ce procédé permettent son adaptation à l'analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative de haute précision.

Ce procédé a été employé plutôt qualitativement que quantitativement pour le contrôle analytique du jus de raisin et du vin, probablement parce que le matériel et la formation des opérateurs sont plus onéreux que les autres méthodes de laboratoire.

Cependant, dans le domaine des recherches sur le raisin et le vin, la chromatographie en phase gazeuse a prouvé son incontestable valeur. Les méthodes qualitatives ont permis l'identification de plusieurs centaines de composants du jus de raisin et du vin. Les méthodes quantitatives ont permis d'élucider les processus biochimiques et suggéré des procédés d'amélioration des vins dans certains cas.

A ce jour, l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse pour apporter une aide à l'expert dégustateur isolé, ou à un collège de dégustateur, a surtout été développée théoriquement.

Il paraît probable cependant que dans l'avenir la chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse et aux ordinateurs, apporteront une aide considérable aux œnologues pour le développement de la qualité des vins.

Mots clés : *Vins — Analyse — Chromatographie gazeuse — Contrôle — Perspectives.*

Introduction

La chromatographie en phase gazeuse ou plus exactement la chromatographie de partage en phase gazeuse est une technique aujourd'hui applicable à l'analyse du vin et qui est appelée à prendre de plus en plus d'importance en vinification.

La chromatographie en phase gazeuse développée pendant les années 1950 à 1960, est basée sur les principes de découvertes beaucoup plus anciennes. On continue à mettre au point cette technique bien qu'il existe aujourd'hui dans le commerce, un grand nombre d'appareils ayant de très bonnes performances.

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des composés différents dans un mélange extrêmement complexe et de les identifier par la mesure du temps de rétention (indice de Kovats). L'identification peut être plus précise en associant spectrométrie de masse et chromatographie.

Le développement des techniques chromatographiques a beaucoup modifié nos anciennes connaissances peu satisfaisantes, sur la composition du vin. Les techniques classiques n'ont permis de doser que les constituants les plus importants du vin : alcools, sucres, acides. En outre, ces techniques utilisaient des dosages basés sur des réactions physico-chimiques caractéristiques de groupements fonctionnels de sorte que l'on ne pouvait pas être assuré de la présence d'un composé défini.

La chromatographie en phase gazeuse repose sur le principe suivant : les différents constituants d'un mélange ont, dans la plupart des cas, des coefficients de partage différents, entre une phase gazeuse et une phase liquide en équilibre. Leur séparation est réalisée si la phase liquide reste stationnaire alors que la phase gazeuse traverse la phase liquide.

La phase liquide est adsorbée sur un solide inerte de petite dimension, logé dans un tube de petit diamètre et de longueur moyenne. Une autre possibilité consiste à recouvrir la paroi interne d'une très longue colonne capillaire avec le liquide. Dans le cas où la colonne contient le solide, celui-ci est presque toujours de la terre d'infusoires. Le liquide adsorbé est chimiquement inerte et possède un point d'ébullition élevé, par exemple, un polyester ou de l'huile de silicone. On fait passer le courant de gaz à travers le tube rempli; là il entre en contact intime avec le mince film de liquide entourant les grains de matière solide inerte placée dans le tube. Dans le cas de colonne capillaire, on fait simplement passer le courant gazeux dans le tube, à faible vitesse, afin de tendre vers un équilibre entre le gaz et le liquide adsorbé sur la paroi interne du tube capillaire.

Puisque la pression partielle de tout constituant dans la phase liquide stationnaire est autant fonction de la température que de la nature de l'échantillon et de la phase liquide, il faut mettre la colonne dans un four dont la température peut soit être maintenue constante, soit augmenter de façon régulière.

La colonne étant la pièce centrale du chromatographe, il faut un système pour introduire l'échantillon à analyser dans le courant de gaz, un système pour maintenir constant le débit de ce courant et un système pour déceler ou mieux encore déceler et recueillir les constituants séparés de l'échantillon. Les échantillons à analyser sont soit des liquides, soit des solides, dont la température de fusion est inférieure à la température du four. Ils sont introduits à travers une pastille en caoutchouc silicone résistante aux températures élevées au moyen d'une seringue hypodermique, dans une chambre de vaporisation à travers laquelle passe le gaz vecteur avant d'entrer dans la colonne.

L'échantillon doit se vaporiser instantanément et entrer dans la colonne à l'état de vapeur dans un volume minimum correspondant au volume de liquide injecté. Dans le cas où l'échantillon contient des substances qui sont décomposées facilement par la chaleur, on peut employer un système d'injection évitant l'exposition de l'échantillon à des températures élevées, celui-ci étant directement injecté dans la colonne.

Afin d'obtenir un bon fonctionnement de l'appareil, il faut maintenir le débit du gaz vecteur inerte dans la colonne à une valeur optimum et constante. L'efficacité de séparation est fonction non seulement du débit du gaz, mais également du fonctionnement satisfaisant du système détecteur dépendant lui-même habituellement, d'un débit constant et défini de gaz vecteur. La résistance au courant

de gaz d'une colonne chargée et de façon moindre d'une colonne capillaire, augmente lorsque la température de la colonne augmente, ceci dans le cas d'analyses avec programmation de température : il faut employer des appareils spéciaux de contrôle de débit, afin de maintenir constante la vitesse du courant gazeux. Dans le cas d'analyses isothermes, on ne peut utiliser que les appareils courants de contrôle de débit. Le chromatographe en phase gazeuse doit comprendre enfin un système de détection des composés séparés provenant de l'échantillon injecté et sortant de la colonne avec le gaz vecteur. Plusieurs techniques différentes et ingénieuses ont été imaginées. Aujourd'hui on utilise habituellement l'un ou l'autre des deux systèmes suivants : le système ancien ayant pour base la mesure de conductivité thermique du courant de gaz sortant de la colonne. L'avantage important de cette technique est que l'échantillon n'est pas détruit; mais sa sensibilité est moins grande que celle de l'autre système classique basé sur la détection des ions produits par la combustion des composés dans une flamme d'hydrogène. Un courant issu du système détecteur, guide après amplification, la plume de l'enregistreur qui permet de tracer le chromatogramme c'est-à-dire un graphique montrant une succession de pics, plus ou moins pointus, en fonction du temps. Cependant, il arrive de plus en plus souvent que le courant du détecteur est envoyé à un microprocesseur entièrement électronique qui donne directement sous forme imprimée une liste des constituants séparés par la colonne, et également leur temps de rétention et leurs concentrations relatives. Ce système présente l'avantage de supprimer toute transmission mécanique.

Le temps mis pour parcourir la colonne est une constante définie de chaque composé organique volatil et stable à chaud. Cette valeur appelée temps de rétention dépend de la nature chimique de la phase stationnaire du liquide adsorbant, aussi bien que des paramètres opératoires de l'analyse. Une égalité des temps de rétention d'un constituant inconnu et d'un composé de référence connu obtenus par analyses avec deux ou plusieurs phases liquides stationnaires de polarités différentes permet de supposer que ces deux substances sont identiques. Afin de prouver qu'il y a vraiment identité, il faut collecter une partie de la substance inconnue à la sortie de la colonne, déterminer les spectres infrarouge et de masse. L'identification est certaine, si ces derniers paramètres sont identiques à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec le composé de référence. Il existe, aujourd'hui des appareils couplés à un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge à réponse rapide. De tels appareils, peuvent fournir soit le spectre de masse soit le spectre infrarouge de chaque composé isolé du mélange injecté dans le chromatographe. Si les résultats sont ensuite traités par un ordinateur contenant une mémoire adéquate on peut identifier d'une manière rapide le composé inconnu. Dans le cas où on veut recueillir des composés isolés à la sortie de la colonne, au lieu d'utiliser le détecteur à conductivité thermique on peut diviser le courant de gaz sortant et en envoyer une petite partie à un détecteur de sensibilité très élevée, et recueillir la partie qui reste.

Application de la chromatographie en phase gazeuse à la vinification

Il faut dans le raisin un équilibre entre les taux de sucre et d'acidité pour obtenir un vin de qualité savoureux et bien équilibré. On a fait du vin pendant des centaines d'années sans l'aide d'aucun instrument technique pouvant déterminer

ces constituants du raisin. On réalisait le contrôle par la dégustation, les observations du climat et par l'établissement de limites légales des dates de vendange. Aujourd'hui nous possédons un certain nombre de techniques analytiques permettant le dosage des sucres et des acides présents dans le raisin. Bien que les anciennes techniques de détermination de la maturité restent satisfaisantes dans les régions de solide réputation viticole, par contre dans les régions viticoles plus récentes, les déterminations des teneurs en sucres et en acides par des moyens technologiques sont très importantes. En utilisant les techniques de chromatographie en phase gazeuse, on peut mesurer de façon très précise les taux de sucres et identifier les différents sucres. Il est possible également d'identifier les différents acides qui contribuent à la composition de l'acidité totale et naturelle du raisin. Ces déterminations nécessitent cependant un temps assez long; c'est pourquoi on les emploie rarement pour déterminer la maturité ou la date des vendanges.

Au cours de la fermentation il est courant de suivre la densité du jus parce que la disparition du sucre et l'apparition de l'alcool entraînent une modification importante de cette densité en fonction du temps de fermentation. Là, on peut également utiliser la chromatographie en phase gazeuse pour mesurer les teneurs en sucre ou en alcool et ainsi suivre la marche de la fermentation, mais cette technique trop lente et trop onéreuse, n'est pas employée pour le contrôle pratiqué dans les chais.

Les autres analyses classiques que l'on effectue au cours de la vinification sont les déterminations des teneurs en anhydride sulfureux et en acides volatils. De temps en temps on effectue des dosages des acides malique et lactique par chromatographie sur papier ce qui permet de suivre la marche de la fermentation malolactique. Il semble qu'il serait très intéressant d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse pour ces deux dernières déterminations, parce que le chromatographe en phase gazeuse permet de bien séparer l'acide acétique des autres acides volatils du vin de l'acétate d'éthyle; ainsi l'œnologue pourrait mesurer de façon précise ces différents constituants, lorsqu'ils se trouvent à une concentration élevée, par suite de l'action des microorganismes, responsables de la pourriture. On pourrait déduire plus facilement la nature des bactéries en cause si l'on connaissait la nature exacte du métabolite. De même, la chromatographie en phase gazeuse fournirait facilement les teneurs en acides lactique et malique; l'œnologue pourrait aisément apprécier la progression de la fermentation malolactique. Bien que cette transformation microbiologique particulière soit très désirée dans le cas des vins de forte acidité, par contre elle est à redouter dans le cas des vins pauvres en acide. La technique actuelle de chromatographie sur papier est valable mais sa précision et son exactitude sont limitées et elle est relativement lente; par contre, la chromatographie en phase gazeuse permet des analyses quantitatives très précises des acides lactique et malique.

Application de la chromatographie en phase gazeuse au contrôle de la qualité

Le terme « contrôle de qualité » ou « garantie de qualité » prend, maintenant, deux significations différentes selon qu'il s'agit du vin ordinaire ou du vin de qualité. Pour le vin ordinaire, la « garantie de la qualité » consiste en ce que les coupages des vins nouveaux soient presque identiques aux coupages antérieurs du même type; le consommateur ne doit pas trouver de différence entre le coupage récent

et les coupages antérieurs. On présumera que l'on est arrivé à définir le type du vin en déterminant la présence des éléments de la qualité recherchée, soit au moyen d'un programme de dégustation soit par l'accueil fait au vin par le consommateur. Le contrôle de ce type de coupage est habituellement basé sur les analyses standardisées d'un laboratoire œnologique ainsi que sur l'avis d'un expert dégustateur. Dans la période qui a suivi la mise au point de la chromatographie en phase gazeuse, on a émis l'hypothèse de remplacer à l'avenir le dégustateur par le chromatographe en phase gazeuse; cela ne s'est pas réalisé et de plus, il semble que seuls les chromatographes en phase gazeuse les plus compliqués et les mieux équipés, puissent aider l'expert-dégustateur dans le domaine du contrôle des opérations de coupage. La raison ou une des raisons de cette difficulté est que le chromatographe en phase gazeuse moderne, fournit tout simplement trop de renseignements; en outre, le chromatographe ne fournit pas d'indication imprimée sur les constituants identifiés ayant une odeur, ni sur les odeurs qui sont souhaitées, celles qui ne le sont pas et celles qui sont tout simplement neutres. Cependant, en utilisant un chromatographe en phase gazeuse très moderne couplé à un ordinateur qui recherche les rapports entre des pics significatifs parmi les centaines de constituants identifiés, il est possible de trouver des correspondances entre les résultats de la dégustation et le paramètre de rapport entre les pics significatifs; ainsi si le chromatographe en phase gazeuse ne remplace pas totalement celui qui fait le coupage, il l'aide probablement.

Dans le cas des vins de qualité, le problème est beaucoup plus compliqué; on a affaire ici à des vins qui diffèrent d'un vignoble à un autre, d'une année à l'autre et d'un œnologue à un autre : chaque vin est une œuvre d'art représentant la plus haute qualité possible pour des raisins particuliers travaillés par un certain œnologue à une époque déterminée. Le chromatographe en phase gazeuse montrera certainement parmi ces vins des différences en fonction du cépage et de la région; toutefois les différences sont si grandes qu'il est très difficile de trouver des rapports entre les différents chromatogrammes et la qualité.

Comme dans les cas précédents, il est possible qu'à l'avenir on puisse trouver des rapports entre les pics significatifs ou d'autres paramètres issus du traitement par ordinateur des données du chromatographe en phase gazeuse, et la qualité des différents vins telle qu'elle est décrite par les spécialistes de la dégustation.

Application de la chromatographie en phase gazeuse aux recherches œnologiques

Il semble qu'il y ait deux processus responsables de l'amélioration de la qualité des vins dans le monde entier. Tout d'abord il y a eu au cours des siècles des intéractions entre les consommateurs et les producteurs de vin dont les résultats furent premièrement la sélection des meilleurs cépages pour chaque région et deuxièmement la mise au point par tâtonnements des procédés de fabrication des meilleurs vins avec ces raisins particuliers. Bien entendu ce phénomène existe encore mais il a été facilité depuis PASTEUR grâce à l'application des principes de la méthode scientifique à la viticulture et à la vinification. On comprend mieux, maintenant, ce qui se passe au cours de la maturation des raisins et de la fermentation des vins qu'avant les années 1860 à 1870; mais la science n'est pas encore parvenue à se passer du collège de dégustation ou de l'expert-dégustateur dans le domaine de l'appréciation de la qualité des vins.

Depuis PASTEUR il semble que les découvertes scientifiques s'accumulent à une vitesse toujours plus rapide. Au cours des 20 dernières années, les techniques de la chromatographie en phase gazeuse furent fructueuses : tout d'abord elles ont permis l'isolement et l'identification de plusieurs centaines de composés chimiques dans les raisins et les vins; ensuite il fut possible de suivre des composés précis au cours de la maturation du raisin ou de la fermentation et de mieux connaître ainsi ces processus biochimiques complexes.

Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'isolement et l'identification des constituants du raisin et du vin

Les plus anciennes études utilisant la chromatographie en phase gazeuse étaient effectuées avec des appareils ayant un détecteur à conductivité thermique. Les résultats obtenus avec des colonnes contenant une phase solide, n'étaient pas du tout satisfaisants parce que ce détecteur était sensible à l'eau contenue dans le raisin et les échantillons de vin : les pics des substances non-aqueuses apparaissaient comme de petites bosses sur le grand pic dû à l'eau. On aurait pu éviter cet inconvénient en séparant par distillation les composés volatils des substances non-volatiles et ensuite en extrayant le distillat afin de séparer les composés organiques de l'eau. On s'est rendu compte que cette méthode, bien que donnant des chromatogrammes bien réussis ne donnait pas les teneurs réelles en composés organiques identifiés dans les raisins ou les vins originaux. La littérature ancienne sur la chromatographie en phase gazeuse est pleine de descriptions de nouveaux liquides d'adsorption utilisables pour les différentes analyses; il est intéressant de noter que les analyses les plus anciennes n'étaient pas capables de distinguer les deux isomères de l'alcool amylique. Cependant, on découvrit plus tard que les colonnes utilisant un polyol tel que le glycérol ou le diglycérol, effectuaient la séparation entre le méthyl-2 butanol et le méthyl-3 butanol. En outre, les colonnes utilisant le diglycérol comme adsorbant actif fonctionnaient très bien pour l'analyse de tous les alcools aliphatiques du mélange d'alcools, des huiles de fusel, jusqu'à l'alcool hexylique normal inclus; les températures exigées pour sortir l'alcool phénéthylique dans un temps raisonnable sont tellement élevées que les pertes en adsorbant sont excessives.

Les appareils anciens étaient souvent équipés avec de longs tubes de diamètre relativement grand; ceci, ajouté au manque de sensibilité et la relativement grande diffusion du détecteur de conductivité thermique, entraînait la formation de larges pics mal séparés. En outre, un certain nombre de ces appareils utilisaient des tubes en cuivre ou en acier inoxydable et des quantités de phase liquide relativement élevées. Le cuivre, en particulier, entraînait des artéfacts au cours de la chromatographie des composés organiques et la grande charge d'adsorbant, bien que permettant l'injection d'un grand volume d'échantillon, entraînait une mauvaise séparation des pics. On a pu remédier à ces problèmes anciens grâce au développement du détecteur à ionisation de flamme et à d'autres détecteurs spéciaux et très sensibles, ainsi que par l'emploi de circuits de gaz aussi courts que possible et comportant des tubes de diamètre aussi petit que possible.

Une deuxième étape importante dans l'amélioration des analyses par chromatographie en phase gazeuse a été l'utilisation des colonnes de verre et le développement des colonnes capillaires. Dans le cas des colonnes chargées il a été possible

d'améliorer la performance des appareils en traitant la phase solide afin d'éviter l'adsorption du gaz sur le solide, ceci permet l'emploi d'une moins grande quantité de phase liquide et augmente la vitesse des analyses.

Une autre étape a été l'abandon des enregistreurs électro-mécaniques dont le temps de réponse était devenu plus grand que la vitesse de sortie des pics séparés; ceci a entraîné le développement du microprocesseur entièrement électronique qui, sans transformations mécaniques, imprime les résultats analytiques avec corrections des variations de la ligne de base et de l'asymétrie des pics; les microprocesseurs les plus perfectionnés peuvent même reconnaître un étalon interne et donner des résultats quantitatifs.

La chromatographie en phase gazeuse a pris un développement supplémentaire par couplage du chromatographe avec un spectromètre de masse à réponse rapide ou avec un spectromètre à infrarouge. Mais, un problème alors se pose : la dilution considérable du composé à doser dans le gaz vecteur; on y a remédié en développant un certain nombre des techniques de séparation préliminaires très ingénieuses qui consistent à introduire un échantillon organique concentré dans l'appareil d'analyse et à envoyer l'excès de gaz vecteur dans l'atmosphère. Ces appareils, en particulier le chromatographe en phase gazeuse associé au spectromètre de masse, fournissent une grande quantité de renseignements dans un temps relativement court; il est courant d'obtenir jusqu'à 100 spectres de masse au cours d'un seul essai de chromatographie en phase gazeuse. On peut augmenter beaucoup la rapidité et l'identification des spectres à condition d'avoir à sa disposition un ordinateur ayant en mémoire une énorme quantité de paramètres, de spectres de masse ou infrarouge; sinon l'œnologue est obligé de comparer ses spectres avec ceux qui se trouvent enregistrés dans les archives; c'est une tâche fastidieuse qui prend beaucoup de temps.

Il faut remarquer que la sensibilité des spectres de masse varie beaucoup avec les différents groupes de composés organiques, les hydrocarbures par exemple; peuvent être identifiés à des teneurs 100 fois plus faibles que celles nécessaires à l'identification des lactones ou des esters. Pour une identification sûre il est très important d'analyser le composé de référence dans les mêmes conditions et avec le même appareil que l'échantillon inconnu.

Lors de l'utilisation d'appareils plus modernes et plus sensibles un autre problème a été soulevé dans le domaine de la recherche sur les raisins et le vin dû au fait que les alcools en sont, après l'eau, les constituants principaux. Lorsque l'on étudie des constituants dont la concentration est de plus en plus faible il se pose le problème de l'élimination des alcools propylique, isobutylique, amylique et phénéthylique présents en quantités relativement élevées. Il faut alors procéder à une analyse en deux étapes. La première étape consiste à extraire sur une colonne chargée les constituants sortant entre les pics des alcools principaux. La deuxième étape consiste à analyser ces constituants secondaires sur une colonne capillaire en utilisant le spectromètre de masse et l'ordinateur pour les identifier.

Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse quantitative des constituants du raisin et du vin

La chromatographie en phase gazeuse a été largement appliquée à l'étude qualitative des raisins et des vins; dans certains cas elle a été utilisée également pour l'analyse quantitative d'un seul constituant. L'analyse quantitative d'un seul

constituant peut être réalisée en utilisant la technique de l'étalon interne et en traçant la courbe donnant réponse de l'appareil en fonction de la quantité du composé contenu dans l'échantillon, tandis que pour l'analyse quantitative très précise d'un mélange de plusieurs constituants il faut employer un étalon interne de groupe équivalent à chaque groupe de composés organiques contenus dans le mélange et tracer également une courbe pour chacun des constituants du mélange. Cette dernière méthode est évidemment difficile et fastidieuse. L'analyse quantitative approximative peut s'effectuer en utilisant des étalons internes moins nombreux et en admettant que tous les constituants d'un mélange suivent la même courbe. La capacité de mémoire des microprocesseurs augmentant, il devient possible de programmer les courbes pour les systèmes comportant de nombreux constituants, de plus en ajoutant un certain nombre d'étalons internes on peut également obtenir des analyses de très haute précision portant sur de nombreux constituants.

Les analyses quantitatives d'un seul constituant sont couramment pratiquées dans les chais pour le dosage de l'éthanol, de l'acétate d'éthyle et de l'acide acétique; par contre, elles sont moins couramment utilisées pour étudier un constituant particulier intéressant tel que l'acide sorbique. Lorsque la longueur des colonnes, les débits de gaz et autres paramètres de manipulation, sont optima, et quand on emploie les systèmes de soupapes contrôlées par minuteries, l'injection automatique et les systèmes d'enregistrement, le temps exigé pour la détermination d'un seul constituant peut être réduit à quelques minutes seulement avec une précision et une exactitude très grandes. Ceci nécessite de l'habileté de la part de l'opérateur afin de s'assurer que l'appareil fonctionne de façon correcte; la principale contrainte de temps réside en la préparation de l'échantillon avec addition de l'étalon interne.

Les analyses quantitatives de l'arôme du jus de raisins ou du vin sont pratiquées suivant la technique connue sous le nom de « head space » (espace de tête); on laisse s'établir un équilibre entre l'échantillon à analyser et la phase gazeuse qui le surmonte à une température donnée; la phase gazeuse est ensuite soit injectée directement dans l'appareil soit concentrée par passage dans un piège réfrigéré qui sépare l'eau des composés organiques puis par passage dans le piège de concentration, où sous l'effet de la chaleur l'échantillon est volatilisé. Il est ensuite introduit dans la colonne, l'analyse obtenue reflète fidèlement les constituants de la vapeur en équilibre avec l'échantillon liquide, mais elle est gênée par le fait que les constituants principaux de la vapeur se trouvent être l'eau et l'alcool éthylique; leurs pics éclipsent tellement ceux des composés organiques intéressants que l'on n'obtient pas beaucoup de renseignements significatifs. La technique est améliorée par l'utilisation comme pièges sélectifs de matériaux polymérisés poreux. Dans ce cas, la phase gazeuse en équilibre avec la phase liquide à analyser passe dans un petit piège contenant le polymère poreux; l'eau et les composés organiques sont adsorbés sur le polymère alors que le gaz est rejeté dans l'atmosphère. Le piège de polymère est alors généralement balayé rapidement par une certaine quantité de gaz inerte jusqu'à ce que la majeure partie de l'eau et de l'éthanol soit volatilisée hors du piège. Il est ainsi possible d'obtenir des analyses beaucoup plus précises de composés organiques intéressants de poids moléculaires élevés se trouvant dans la vapeur en équilibre soit avec le jus de raisins, soit avec le vin.

Il est probable que lors de l'entraînement de l'eau et de l'éthanol de petites quantités d'autres composés organiques de faibles poids moléculaire à point d'ébullition bas, soient également perdues. Il est fort possible que des composés tels que le méthanol, le formiate de méthyle, l'acétate de méthyle, le formiate d'éthyle,

le formaldéhyde et l'aldéhyde acétique soient entraînés avec des quantités beaucoup plus importantes d'eau et d'alcool éthylique. En outre, même si l'on opère comparativement en utilisant des temps et des températures rigoureusement identiques, des différences de composition entre les échantillons peuvent entraîner de petites différences entre les quantités de composés perdus par entraînement avec l'eau et l'alcool éthylique. C'est pourquoi la technique « head space » utilisant un piège à polymère poreux ne peut être considérée que comme une technique semi-quantitative. Par contre, pour les échantillons dont la composition varie peu, elle peut donner des analyses comparatives valables montrant soit les variations entre les différents constituants, soit les variations entre les rapports des constituants ce qui peut être associé soit aux résultats d'un collège de dégustateurs, soit à la conduite de la vinification. Bien que n'étant pas idéale, cette technique reste la meilleure méthode dont nous disposions pour estimer la nature et les teneurs relatives des composés organiques de poids moléculaire élevés constituant la vapeur, en équilibre soit avec le jus de raisin soit avec le vin.

Cette technique nous donne une image qui se rapproche beaucoup plus de ce que nous percevons dans le jus de raisin ou dans le vin, que celle de l'extraction par solvant non-miscible au jus de raisin ou au vin qui donne la composition approchée des composés à point d'ébullition élevé se trouvant dans la phase liquide.

Summary

The application of gas chromatography on the analytical control of wine

Gas chromatography, an analytical technique developed within the past twenty-five years, is based upon the principle of differential partition of the components of a mixture of organic compounds between a liquid phase and the gas phase in equilibrium with the liquid. Modifications of the procedure permit its adaptation to qualitative, semi-quantitative, and highly accurate quantitative analyses. Its use in the analyses of grape juice and wine for quality control have been mostly in the qualitative rather than quantitative aspects. Reasons for this probably are that the equipment and the training of operators make the procedure considerably more expensive than other laboratory methods. In the realm of grape and wine research, however, the techniques of gas chromatography have proven of outstanding value. Here, qualitative procedures have permitted identification of several hundred components of grape juice and wine. Quantitative procedures have permitted elucidation of biochemical pathways and suggested procedures for the ameliorating of the quality of wines in many cases. To date, the use of the gas chromatograph as a supplement to the expert single taster or the taste panel has been mostly theoretical. It seems likely, however, that in the future results from gas chromatographs coupled to mass spectrometers with the data processed by computer will be of considerable help to enologists in further improvement of the quality of wines.

Key-words: *Wines — Analysis — Gas chromatography — Perspective control.*

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 421-422

INTERVENTION

Colonnes de phase mixte par l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des fermentations alcoolique et acétique

Mlle D. CABEZUDO

Institut des Fermentations Industrielles,
Madrid (Espagne)

Bien que les composants de la fermentation alcoolique et acétique soient très nombreux il est évident qu'ils ne présentent pas tous le même intérêt pour l'analyste.

De même, les critères qui poussent à sélectionner dans chaque cas les composants que l'on a à analyser varient aussi selon les circonstances. C'est pourquoi il est intéressant d'exposer en détail un cas de grande actualité et d'élaborer une méthode d'analyse appropriée à son étude.

En analyse de contrôle il est à souhaiter que l'échantillon à analyser subisse le moins de manipulations possible afin que sa composition ne soit pas modifiée ni qualitativement ni quantitativement. Ceci oblige à accepter une solution de compromis qui consiste à injecter l'échantillon directement, en courant le risque de ne pas détecter quelques-uns des composants qui existeraient à basse concentration.

Les données ainsi obtenues peuvent servir à établir des corrélations entre les résultats chromatographiques et les appréciations de l'odeur données par les dégustateurs et il convient de déterminer quantitativement le plus grand nombre possible de substances volatiles. Des essais réalisés en utilisant les deux techniques (l'analyse sensorielle et la chromatographie en phase gazeuse) peuvent indiquer quels sont les composants intéressants du point de vue sensoriel et en conséquence quels seuils de détection il convient d'établir pour une population déterminée. De cette manière on peut arriver à aborder le problème consistant à établir des « indices de qualité ».

A ce sujet nous estimons de la plus grande importance que les composants pris en considération soient choisis du point de vue sensoriel, qu'il n'en soit pas inclus d'autres ne présentant pas ce caractère et enfin que les données chromatographiques procèdent de pics unitaires bien définis. Les calculs statistiques nécessaires, d'ordinaire laborieux, en seront ainsi facilités.

En dernier lieu il faut signaler que de nombreux composants des produits de la fermentation sont identiques, bien que provenant de matières premières variées (raisin, céréales, canne à sucre) et même dans le cas de transformations postérieures à la fermentation alcoolique (fermentation acétique). Pour cette raison, la méthode analytique souhaitable doit permettre l'analyse d'échantillons de natures très différentes.

Nous avons trouvé vingt composants plus volatils, en quantité suffisante pour être détectés par analyse par injection directe, dans des échantillons de vins de table, vins de Xérès, eaux-de-vie, brandies, cognacs, wyskies, rhums et vinaigres. Ce sont : acétaldéhyde, propanol, acétate de méthyle, formiate d'éthyle, méthanol, acétate d'éthyle, propanol-1, propionate d'éthyle, acétate de propyle, butanol-2, acétal diéthylique, méthyl-2-propanol-1, acétate de 2-butyle, acétate d'isobutyle, butanol-ester éthylbutyrique, acétate de butyle, méthyl-3-butanol, diméthyl-1-2-butanol-1, acétate d'isopentyle.

Certains d'entre eux ne se trouvent que dans certains types d'échantillons et pas dans d'autres; en général, ceux qui sont communs se trouvent à des taux de concentration d'une différence significative selon le type d'échantillon dont il s'agit. Par injection directe, nous n'avons pas détecté d'autres composants différents de ceux qui sont signalés et dont la fréquence ou la concentration auraient amené à allonger la liste citée plus haut. C'est pourquoi nous avons rédigé une méthode d'analyse commune utilisant deux colonnes d'acier inoxydable de 1,8 mm de diamètre externe et 2 mm de diamètre interne, remplies de chromosorb G, HP (lavé aux acides et aux alcalis et silanisé) et imprégné des deux mélanges de phases indiqués dans le tableau 1, où figurent aussi les autres conditions opératoires.

TABLEAU I

Caractéristiques des colonnes et conditions d'opération

Colonne	Mélange de phases (%)	Longueur (m)	Température isotherme (°C)	Débit gaz N_2 cc/mn
A	Squalane, 5 % + Carbowax 300, 90 % + Di-2-éthyl-héxyl-sebacate, 5 %	4,76	50	20
B	Ucon LB 550X, 50 % + Carbowax 300, 50 %	6,66	50	23

Les p. 100 indiqués dans le tableau 1 sont relatifs et c'est en se basant sur eux qu'on doit calculer la quantité totale de phase pour qu'elle ne dépasse pas 5 p. 100 du poids du support, quantité maximum pour enrober le Chromosorb G. On conseille de préparer le remplissage avec une quantité totale de phase équivalente à 2,5 p. 100 du poids du support.

Ann. Technol. Agric., 1977, **27** (1), 423-426

INTERVENTION

Application de la chromatographie en phase gazeuse à la caractérisation des variétés

A. RAPP et H. HASTRICH

Station de Recherche de Geilweilerhof, Siebeldingen (Bundesrepublik Deutschland)

Les arômes contribuent essentiellement à l'appréciation analytique des caractères et de la qualité des vins mais également du cépage car une grande partie des substances aromatiques pré-existent dans les baies de raisin.

La figure 1 montre des secteurs comparables (12e à 82e minute) des aromagrammes de différents cépages pour une même maturité et une même origine géographique (A = Morio-Muskat, B = Riesling, C = Silvaner, D = B-6-18). Ces secteurs représentent environ le 1/3 de l'aromagramme complet. On reconnaît des différences quantitatives nettes entre les divers cépages pour certains composants qui se révèlent ainsi être des substances fondamentales de l'arôme. En comptabilisant ces substances fondamentales, on obtient des valeurs de relation permettant de distinguer spécifiquement chaque cépage.

En ce qui concerne l'influence de la maturité, pour des échantillons de Riesling de 32,5° à 88,0° Oechsle, on a constaté que les constituants qui seront plus tard les composants principaux apparaissent dès le premier prélèvement; par ailleurs, les valeurs de relation entre les constituants fondamentaux restent significatives au cours de la maturation malgré l'augmentation de la concentration de ces substances. Une observation semblable a été effectuée pour les autres cépages étudiés (fig. 2). Cependant, pendant le même temps, la concentration de certaines substances diminue; ceci devrait pouvoir être une base d'appréciation de la « maturité des arômes ».

En ce qui concerne l'influence du lieu d'implantation (région, orientation, sol), il a été constaté que les valeurs de relation entre les substances fondamentales restent caractéristiques du cépage malgré des degrés de maturité différents (72 à 95° Oechsle) ceci est particulièrement net pour le Riesling. Le cépage « Moriot muskat » possède en outre quelques substances fondamentales qui permettent de le différencier clairement des autres cépages, notamment du Riesling.

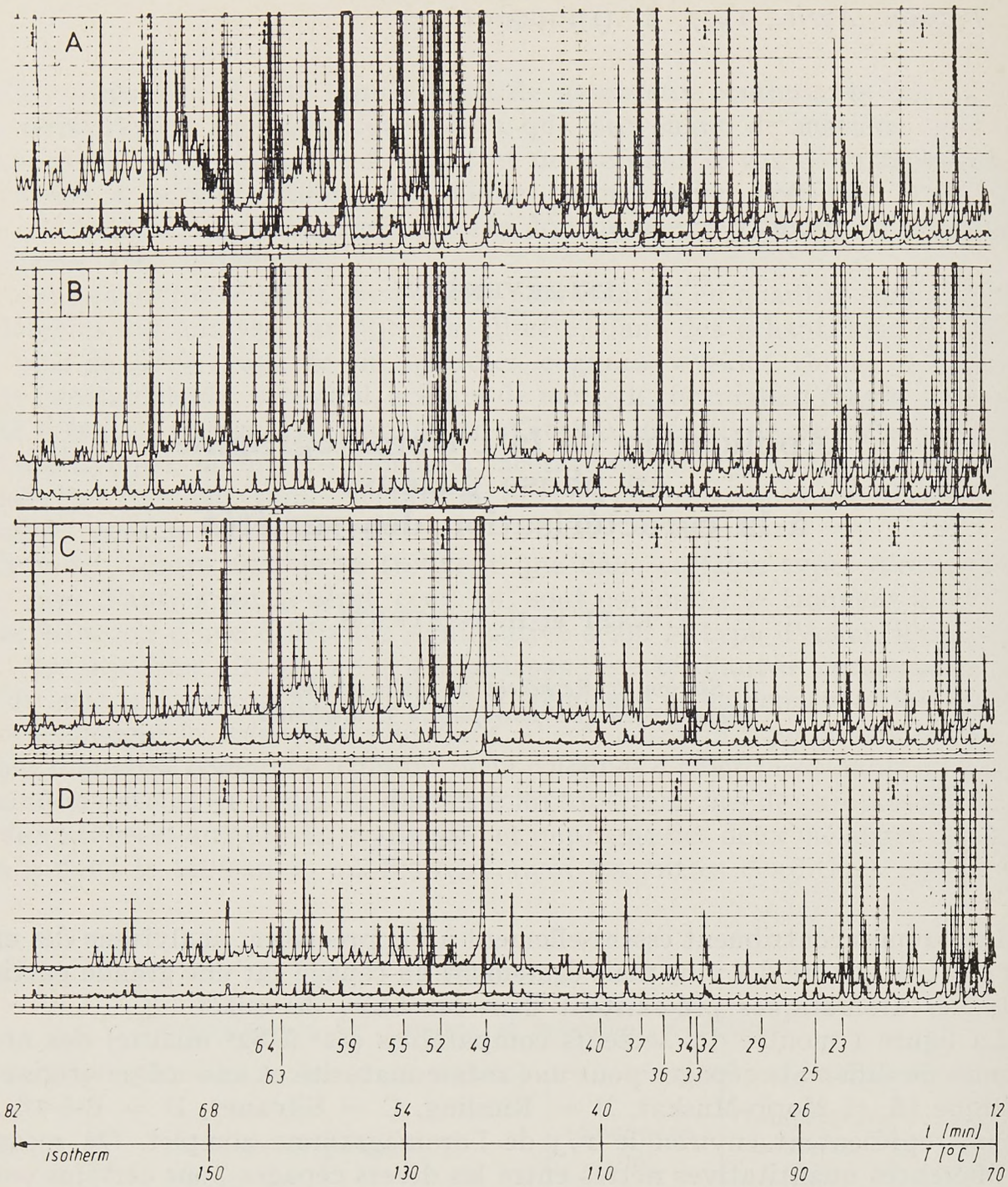


FIG. 1. — *Aromagrammes de raisins de variétés différentes.*
A : Morio-Muskat. B : Riesling. C : Silvaner. D : B -6-18.

Temps de rétention (en mm)	Morio-Muskat (1) 55°-72°	Riesling 59°-87°	Silvaner 54°-71,5°	B-6-18 (2) 46°-75°
55/23	10 - 29	0,2- 1	0,06- 0,5	0,04- 0,2
55/25	43 -217	1 - 2	0,2 - 2	0,5 - 15
55/34	47 -289	4 - 17	0,2 - 2	1 - 20
49/29	0,4 - 10	4 - 33	330 -2 500	2 -168
49/36	0,05- 1	0,5- 13	110 - 469	0,5 - 20
49/52	0,2 - 1	0,3- 10	55 - 417	1 -67
64/63	12 -245	103 -771	74 - 165	7 - 34
64/34	17 - 82	43 -257	2 - 29	1 - 7
23/33	0,4 - 0,5	2 - 5	0,6 - 11	90 -813
63/59	0,02- 0,07	0,2- 0,3	0,7 - 2	63 -575

(1) Neuzüchtung, Geilweilerhof (Kreuzung : Silvaner × Weißburgunder).
(2) Neuzüchtung, Geilweilerhof (Kreuzung Oberlin 595) F_1 × Foster's White Seedling).

FIG. 2. — *Constituants aromatiques de différentes variétés de raisins (valeurs relatives)*

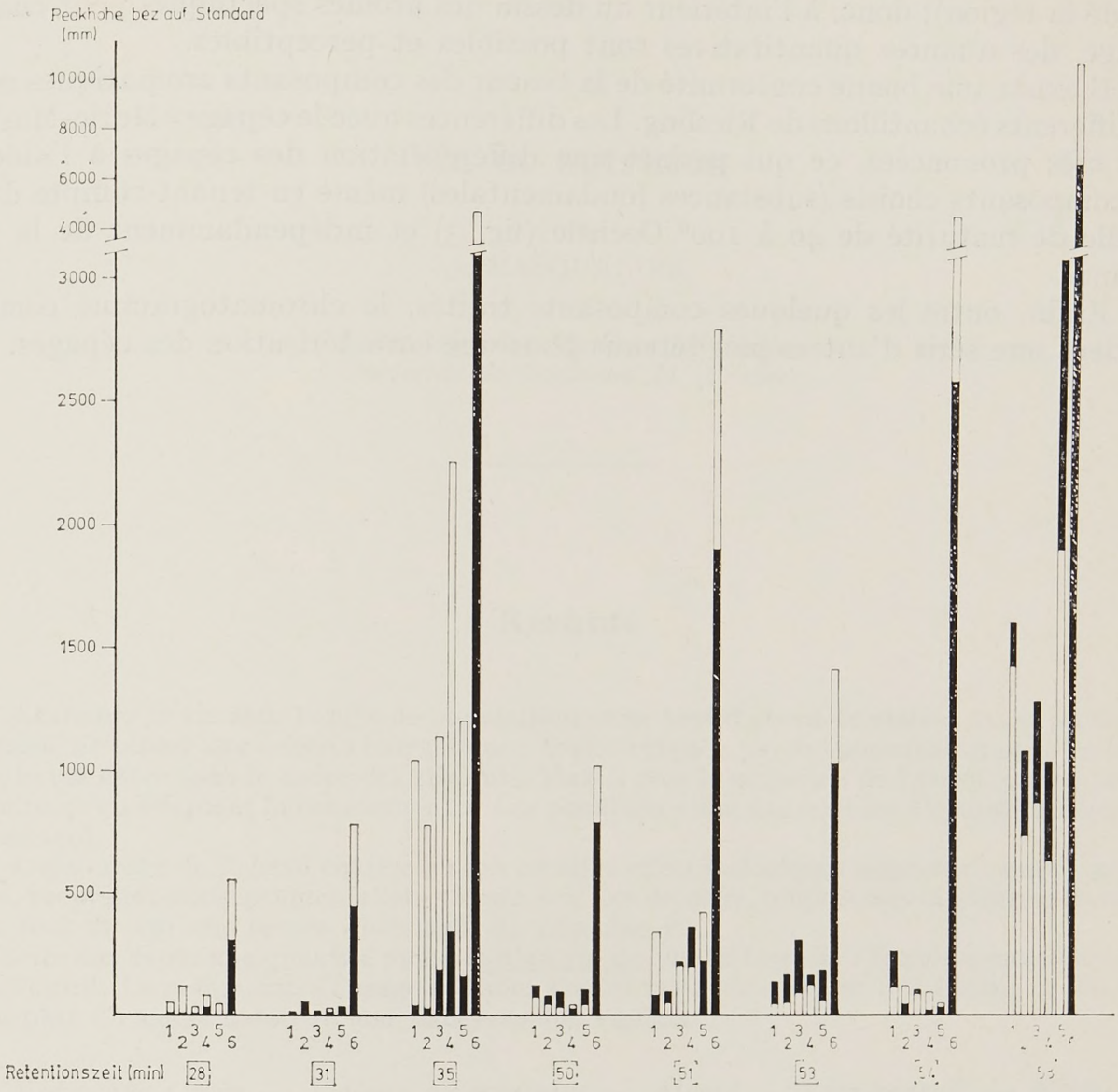


FIG. 3. — « *Substances fondamentales* » *de Riesling et Morio-Muskat de différentes régions et degrés de maturité.*

			□	■
1 :	Riesling	Winnenden/Remstal	76 °Ochsle	41 °Ochsle.
2 :	Riesling	Trier	73 °Ochsle	47 °Ochsle.
3 :	Riesling	Geisenheim	100 °Ochsle	64 °Ochsle.
4 :	Riesling	Würzburg	88 °Ochsle	61 °Ochsle.
5 :	Riesling	Geilweilerhof	88 °Ochsle	59 °Ochsle.
6 :	Morio-Muskat	Geilweilerhof	75 °Ochsle	59 °Ochsle.

Toutefois, les teneurs de quelques composants aromatiques sont influencées par la maturité et le lieu d'implantation (sol, climat déterminant le caractère typique de la région); donc, à l'intérieur du dessin des arômes spécifiques pour chaque cépage, des nuances quantitatives sont possibles et perceptibles.

Il existe une bonne conformité de la teneur des composants aromatiques entre les différents échantillons de Riesling. Les différences avec le cépage « Morio-Muskat» sont très prononcées, ce qui permet une différenciation des cépages à l'aide de ces composants choisis (substances fondamentales) même en tenant compte d'une échelle de maturité de 40 à 100° Oechsle (fig. 3) et indépendamment de la provenance.

Enfin, outre les quelques composants traités, le chromatogramme complet contient une série d'autres pics retenus pour une caractérisation des cépages.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1), 427-439

Vin et nutrition

J. MASQUELIER

Laboratoire des Matières Médicales,
Université de Bordeaux II (France)

Résumé

Examiner le vin sous l'angle de la nutrition exige tout d'abord de statuer sur sa valeur alimentaire. Se pliant aux critères énergétiques, toxicologiques, psycho-sensoriels et socio-économiques, le vin entre dans le cadre des aliments. Mais il pose le problème de l'alcool, qui ne peut se résoudre qu'en adaptant la consommation aux possibilités non dangereuses d'épuration hépatique de l'éthanol.

L'entourage de l'alcool confère au vin certains effets biologiques originaux : meilleure tolérance, propriétés antiseptiques, effets vasculaires. Ces derniers, propres aux oligomères flavanoliques, font du vin une source abondante de vitamine P.

Boire aux repas une quantité modérée d'un vin de qualité favorise l'épanouissement du corps et de l'esprit. La marge entre l'usage et l'abus s'avère malheureusement très étroite, ce qui exige de la part du consommateur une indispensable vigilance.

Mots clés : *Vin — Valeur alimentaire — Alcool — Vitamine P — Effets biologiques.*

Introduction

De 1970 à 1972, j'ai eu l'honneur de participer aux travaux du groupe « Vin et Nutrition » animé par TREMOLIÈRES. Sous le titre : « Du bon usage du vin », les réflexions de ce groupe ont été publiées en 1973. Depuis, TREMOLIÈRES nous a quittés, perte irréparable dont nous mesurons chaque jour l'étendue. Le thème « Vin et Nutrition », conclusion logique des travaux du présent Symposium nous avait été conjointement proposé et j'avais pris contact avec TREMOLIÈRES en vue d'harmoniser nos interventions. Demeurant seul à la tâche, j'ai voulu que mes propos respectent fidèlement la pensée de celui qui, infiniment mieux que moi, aurait pu définir les conditions dans lesquelles l'usage du vin peut contribuer au maintien de notre santé.

Que ce thème ait été placé en clôture des travaux de ce Symposium par ses

organisateurs me semble révélateur de l'esprit quianime l'École bordelaise. Soucieux d'informer ses élèves sur le rôle joué par le vin dans l'alimentation humaine le Professeur J. RIBÉREAU-GAYON a bien voulu, depuis plus de 20 ans me confier un enseignement dans son Institut. Le meilleur des vins, celui dont l'œnologue peut, à juste titre tirer fierté n'est pas destiné à vieillir dans un musée mais à agrémenter la table du connaisseur. Le vin s'intègre donc parfaitement dans le régime alimentaire des civilisations de la vigne. Ceci oblige toutes les professions du vin à se soumettre à certaines contraintes puisque le produit de leur activité doit posséder les qualités minimales exigées de tout aliment.

En 1961, figurait pour la première fois dans le Traité d'Oenologie de RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD un chapitre intitulé : « Le vin dans l'alimentation humaine », où j'exposais l'état de la question à cette époque. Depuis, bien des progrès ont été enregistrés dans ce domaine, en particulier sur le métabolisme de l'alcool, ce qui exige d'actualiser notre étude. Certains résultats anciens demeurent acquis, beaucoup doivent être remaniés. Mais il existe encore bien des zones d'ombre. Comment en serait-il autrement, à propos d'un aliment aussi complexe que le vin, riche de centaines de constituants dont une dizaine à peine sont bien connus des nutritionnistes? Le présent rapport constitue donc une nouvelle étape dans la lente quête du savoir. Reconnaissons avec humilité que notre ignorance dépasse de loin notre science, ce qui nous interdit tout dogmatisme et toute prise de position définitive dans le mouvant terrain de la nutrition.

Le dogmatisme, nous le rencontrons, hélas, trop souvent, dans la profession. Il se formule ainsi : « Le vin est un produit naturel; consommé depuis des millénaires il ne saurait en aucune façon nuire à la santé ». Cette opinion catégorique entraîne un certain nombre de conséquences :

— les professionnels du vin n'accordent que peu d'intérêt à la valeur nutritive de leur production. Ainsi, les études conduisant au diplôme national d'œnologue ne comportent aucun enseignement de diététique;

— un accueil favorable est réservé à toute littérature pseudo-scientifique ou poético-médicale chantant les louanges du vin. Les omissions, les erreurs, les contre-vérités foisonnent dans ces ouvrages, dont le niveau scientifique a cinquante ans de retard;

— lorsque la situation l'exige, il est toutefois fait appel aux nutritionnistes. Mais leurs conclusions ne seront retenues que si elles s'avèrent conformes au dogme. « Quand mes amis sont borgnes, je les regarde de profil! » Tel est en somme le comportement souhaité chez l'expert que l'on vient consulter.

Ces quelques remarques feront sans doute comprendre aux professionnels du vin combien il nous est difficile de poursuivre des travaux sur la valeur nutritive de leurs produits lorsque la recherche de la vérité est notre seul souci. Malgré tout, depuis bientôt 30 ans, nous persévérons dans cette voie, estimant que la défense du vin exige une parfaite connaissance non seulement de ses qualités mais aussi de ses points faibles.

Valeur alimentaire du vin

La nutrition englobe l'étude de nombreuses denrées qui ne sont pas, stricto sensu, des aliments. Il en est ainsi de l'eau, qui participe à la vie de chacune de nos cellules et constitue la majeure partie de la masse corporelle. Cependant, le nutritionniste accorde une attention toute particulière aux aliments proprement

dits, car les produits ainsi désignés interviennent directement dans le maintien de notre santé. Il importe donc de bien délimiter la valeur alimentaire du vin. Mais qu'entendons-nous au juste par « aliment »?

Définition de l'aliment

Considéré sous l'angle de la santé, l'aliment doit, selon TREMOLIÈRES (1965), répondre aux critères suivants :

— il doit couvrir les standards nutritionnels de l'homme. L'aliment doit non seulement apporter des nutriments, mais encore les fournir en judicieux équilibre. Un aliment ne comportant qu'un seul nutriment, ou des nutriments appartenant tous à la même classe, est donc déséquilibré, et le régime devra par ailleurs redresser une telle lacune. Le chocolat, par exemple, très riche en glucides et en lipides mais dépourvu de protides, souffre d'un tel déséquilibre;

— il doit procurer des sensations digestives agréables, qui lui confèrent son acceptabilité;

— il doit provoquer des effets physiologiques favorables. Ainsi, le sucre soutient l'effort musculaire, la viande exerce un effet fortifiant de longue durée;

— il doit présenter une parfaite innocuité, résultant de l'absence de toxiques, qu'ils soient intrinsèques ou introduits par une technologie défectueuse.

Par ces quatre critères se définissent donc la valeur alimentaire et les qualités nutritives d'un produit destiné à maintenir chez l'homme l'état de bonne santé. Mais en réalité, la définition de l'aliment va bien au delà de ces considérations matérielles : elle doit en effet tenir compte de ce que la nourriture s'adresse à la fois au corps et à l'esprit. Ainsi, tout aliment sera doué d'un certain tonus émotif. Il doit remplacer diverses sensations désagréables par un état de « bien-être » tout à fait subjectif. Les aliments légers, rafraîchissants, apaisants ou au contraire excitants, répondent aux conditions actuelles de la vie urbaine. En revanche, l'exercice d'une activité pénible à la campagne fera rechercher les aliments gras, lourds, nourrissants, dont la seule évocation écœure le citadin. Le critère « naturel » ou « biologique », tellement en vogue et diamétralement opposé au « fabriqué » ou « industriel » traduit le regret inavoué du « bon vieux temps », de l'âge d'or supplanté par la société industrialisée. Réaction émotive fort respectable, même si elle repose sur une méconnaissance profonde des abominables erreurs nutritionnelles dont a souffert l'humanité jusqu'au début de ce siècle.

En outre, l'aliment est chargé d'une valeur symbolique. Nous reconnaissons à l'aliment, de façon intuitive, une valeur sociale qui facilite les échanges affectifs. Sur lui repose en grande partie le charme de l'hospitalité. Le compagnon, c'est celui avec qui nous partageons le pain. Le Symposium, élément essentiel de la vie sociale chez les anciens grecs, c'est « boire ensemble » à la fin du banquet.

Pour accéder à la valeur de symbole, l'aliment doit subir une préparation culinaire et revêtir une forme de présentation qui varient énormément suivant les milieux sociaux. Certaines ethnies d'Amérique centrale, en proie à la famine, ont préféré mourir de faim plutôt que consommer le lait en poudre donné par les organismes de secours. Chez ces populations, le lait n'est pas considéré comme un aliment, car toute valeur symbolique lui fait défaut. En revanche, une émulsion laiteuse à base de maïs sera parfaitement acceptée.

De la même façon, le critère économique intègre l'aliment dans le milieu social. Un produit obtenu sur le sol national par l'effort des hommes qui, ainsi, contribuent à la richesse de leur pays sera bien mieux reçu que la denrée étrangère dont

la consommation favorise des intérêts concurrentiels. Toutefois, la mode, le snobisme peuvent agir en sens inverse et faire accepter, par un milieu social particulier, un aliment parfois bien inférieur en qualité à ce qu'offre le pays natal. Ceci ne fait que confirmer la valeur de symbole qui s'attache à la notion d'aliment.

Le vin répond à cette définition

Indéniablement, le vin répond aux critères psycho-sensoriels et socio-économiques que nous venons d'évoquer. Non seulement il procure la sensation de bien-être que l'on attend de toute boisson alcoolisée, mais il y ajoute une valeur symbolique unanimement reconnue. Ce n'est pas sans raison que diverses religions l'ont intégré dans leurs liturgies. Merveilleux « lubrifiant social », le verre de vin scelle les réconciliations, instaure la détente et dédramatise les situations les plus crispées. En tant que symbole, il puise ses vertus aux origines de l'humanité. Issu d'un fruit mûr, c'est un rayon de soleil toujours disponible, et qui nous dispense un peu de sa bienfaisante vigueur...

Notre opinion sera évidemment plus nuancée à propos des critères physiologiques, innocuité et qualités nutritives. Conforme à sa définition légale, le vin ne saurait renfermer de constituants toxiques intrinsèques : le raisin n'en recèle pas, et le processus de fermentation non plus. S'il s'en rencontre dans le vin, ils sont le fait d'une technologie défectueuse et peuvent en conséquence être évités. L'œnologue trouve ici l'une de ses responsabilités majeures. Sa vigilance devra s'exercer tout particulièrement à l'égard des produits de grande consommation, dont le moindre défaut se trouve multiplié par la fréquence de l'usage. Malheureusement, les manipulations inhérentes à ce type de vins accroissent notablement les risques d'altération : le consommateur quotidien est donc le moins bien protégé.

Quant au critère nutritif, il se résume presque uniquement à la présence de l'alcool, constituant pondéralement majoritaire hormis l'eau. L'alcool, molécule fortement énergétique, franchit rapidement la barrière digestive et diffuse dans notre organisme en quelques minutes, sans modification biochimique immédiate.

Le vin répond donc bien à la définition de l'aliment, sous les diverses facettes que nous avons envisagées. Toutefois, pour le nutritionniste, ce jugement appelle un certain nombre de commentaires.

Le problème de l'alcool

Contrairement aux autres constituants du vin (eau, sels minéraux, acides organiques, vitamines, polyphénols, glucides, protides) communs à la plupart des aliments d'origine végétale, l'alcool pose un grave problème nutritionnel. On ne peut se dispenser pour résoudre ce problème, d'étudier avec précision ce que devient dans notre organisme l'alcool que nous consommons.

Métabolisme de l'alcool

Lorsque nous ingérons du glucose, notre organisme dispose de deux possibilités métaboliques : ou bien ce glucide sera utilisé dès son passage dans le sang pour ses propriétés énergétiques, ou bien il sera mis en réserve dans le foie après transformation en glycogène. Avec l'alcool, aucun de ces deux processus n'est envisageable :

l'éthanol ne peut servir directement de combustible cellulaire, et notre organisme ne dispose à son égard d'aucune faculté de stockage. Il faut impérativement que l'alcool qui a diffusé dans nos tissus à partir du sang subisse une épuration chimique dont le foie a seul la charge. A peine 5 p. 100 de l'alcool ingéré s'élimine en nature (air expiré, urine, sueur); 95 p. 100 reflue donc vers le foie où s'instaurent les dégradations enzymatiques schématisées sur la figure n° 1 et qui résument le métabolisme de l'éthanol.

Pour une consommation non excessive, chez un sujet non alcoolique l'épuration s'opère par la voie centrale ADH (Alcool-déshydrogénase) qui consiste à porter sur le cofacteur NAD les deux hydrogènes arrachés à l'éthanol. Il s'agit donc d'une déshydrogénation et l'éthanol se retrouve sous sa forme oxydée,

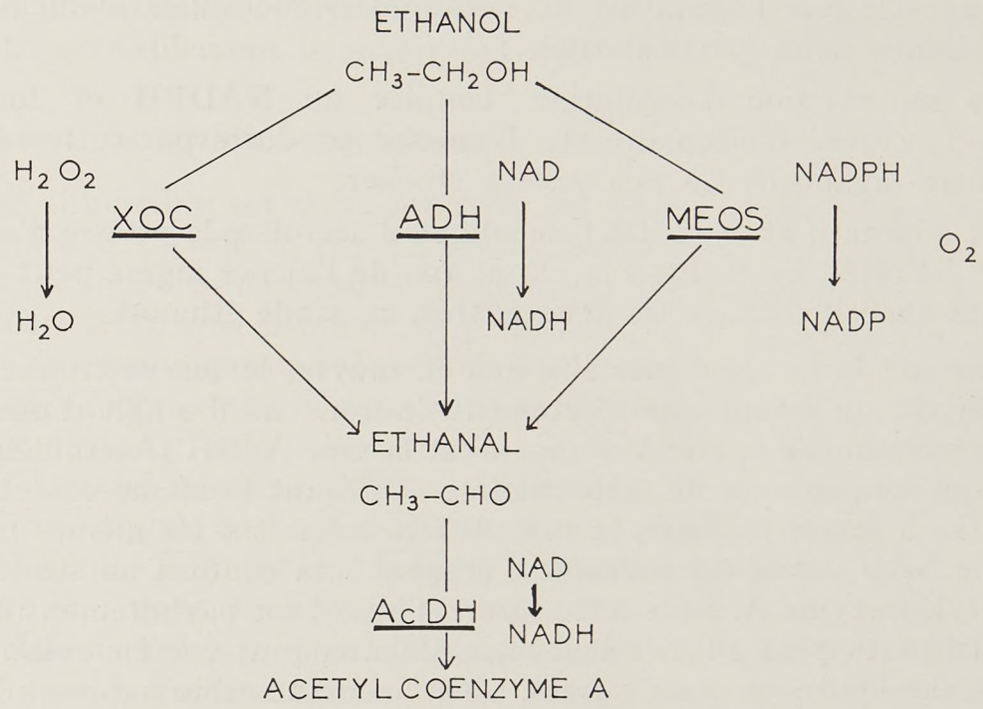


FIG. 1. — *Dégradations enzymatiques de l'alcool dans le foie.*

l'éthanal ou acétaldéhyde CH_3CHO tandis que le cofacteur revêt sa forme réduite NADH. Deux remarques essentielles à propos du système ADH-NAD :

— Ce système n'est pas adaptatif : le foie dispose d'une teneur fixe d'ADH, et ce taux ne s'accroît pas en fonction de la dose d'alcool ingérée. Le système ne s'adapte donc pas aux circonstances; seules des variations individuelles, génétiques, peuvent exister.

— La réoxydation de NADH est un facteur limitant : lorsque NAD a pris en charge les 2 H arrachés à l'alcool, il doit se débarrasser de ce fardeau, sinon, par manque de cofacteur, l'ADH cesse sa fonction. Lorsque la quantité de NADH produite est assez faible pour être utilisée intégralement par la respiration cellulaire, qui assure le retour à la forme oxydée NAD, le métabolisme de l'alcool se poursuit. En revanche, tout excès de NADH inhibera le processus d'épuration.

Notre organisme se trouve vite débordé lorsque la consommation d'alcool dépasse les possibilités de ce premier système. En ce cas, deux autres voies d'épuration viennent à la rescousse (fig. 1) :

— La voie XOC (Xanthine-oxydase Catalase) :

Ici encore, l'éthanol perd 2 H et se retrouve oxydée en éthanal, mais les

hydrogènes ne sont plus confiés au NAD. C'est un peroxyde qui s'en charge, avec production d'eau :

$$H_2O_2 + 2H \rightarrow 2\ H_2O$$

Tout repose sur ce peroxyde, absent du foie à l'état normal. Pour l'obtenir, l'organisme peut mettre en œuvre l'enzyme xanthine-oxydase, qui produira H_2O_2, à condition que la démolition de molécules protéiques lui fournisse le substrat voulu. C'est ainsi que la voie XOC entraîne le catabolisme des nucléotides et provoque la dénutrition azotée chez l'alcoolique. TREMOLIÈRES compare ce mécanisme à un mauvais charbon qu'on ne peut faire brûler qu'en lui ajoutant un combustible de meilleure qualité.

— Le système MEOS, système hépatique microsomique d'oxydation de l'éthanol décrit en 1968 par LIEBER (LIEBER et de CARLI, 1968). Voisin du mécanisme qui assure dans le foie l'épuration de nombreuses molécules médicamenteuses, le MEOS présente deux particularités :

- c'est une réaction d'oxydation, couplée au NADPH et fonctionnant en présence d'oxygène moléculaire O_2. L'énergie produite par cette réaction est gaspillée, notre organisme ne pouvant la stocker;
- il est adaptatif et permet à l'alcoolique d'accroître la vitesse d'élimination sanguine de l'éthanol. Selon LIEBER, 20 p. 100 de l'alcool ingéré peut emprunter cette voie qui aboutit, comme les deux autres, au stade éthanal.

Quel que soit le système primaire mis en œuvre, le foie se trouve confronté à l'acétyldéhyde, qu'il faut immédiatement épurer, car il s'agit d'une molécule hautement réactionnelle et très toxique. C'est la voie AcDH (Acétaldéhyde-déhydrogénase) qui sera chargée de cette mission. Utilisant le même cofacteur que le système ADH, à savoir le NAD, la voie AcDH connaîtra les mêmes limitations. Si le taux de NAD oxydé est suffisant, l'éthanal sera conduit au stade d'acétate actif ou acétylcoenzyme A. Sous cette forme, l'alcool est parfaitement déspécifié : l'acétate actif participera au métabolisme cellulaire, tout comme celui provenant des glucides, des lipides ou des protides. C'est le combustible habituel des cellules vivantes.

Conséquences nutritionnelles

L'alcool transmet au vin son pouvoir énergétique. Oxydé jusqu'au stade ultime de CO_2 et H_2O, 1 g d'alcool produit environ 7 calories. Un litre de vin à 12° apporte donc 700 calories. Malheureusement, nous ne pouvons pas comptabiliser cet apport énergétique comme s'il provenait d'un sucre ou d'une graisse, car nos besoins caloriques ne peuvent être entièrement couverts par l'alcool.

Les calories de l'alcool ne sont pas immédiatement disponibles :

Parvenu rapidement dans le sang, l'alcool ne sera dégradé que très lentement, au rythme imposé par le foie et défini par le coefficient d'éthyloxydation (C.E.O.), soit en moyenne 100 mg par h et par kg de poids corporel. Une activité musculaire brusque et intense ne modifie en rien le taux d'ADH hépatique et, par conséquent, n'accroît pas la valeur du C.E.O. Il est donc bien exact que l'alcool s'avère inutilisable pour soutenir un exercice musculaire immédiat. En revanche, lorsqu'il est parvenu au stade d'acétate actif, l'alcool peut subvenir aux besoins énergétiques du muscle, ne serait-ce qu'en épargnant les autres nutriments disponibles.

Le système normal d'épuration est vite saturé :

Malgré les variations individuelles parfois importantes, la valeur moyenne du C.E.O. nous montre qu'un sujet de 70 kg ne peut épurer que 100 mg × 70 × 24 = 168 g d'alcool en 24 h, ce qui correspond à un apport de 1 176 calories. Une consommation plus élevée entraîne la saturation du processus enzymatique normal et la mise en œuvre des voies de secours dont nous avons décrit les dangers. Parallèlement, la stagnation dans le sang déclenche les effets pharmacologiques de l'alcool, particulièrement nets au niveau du système nerveux central, d'abord excité puis ensuite déprimé.

Mais il faut bien comprendre la valeur toute théorique du calcul précédent, qui suppose que les 168 g d'alcool ont été ingérés en 24 prises égales au cours des 24 h, afin de ne pas dépasser le taux de 100 mg. Dans la vie courante, la consommation n'est jamais aussi éparpillée : ces 168 g ingérés en 3 prises, par exemple, entraîneront inévitablement la saturation du système ADH à chaque ingestion.

Importance du rythme d'ingestion :

La dose admissible est donc fonction du rythme d'ingestion : elle devient très inférieure à la théorie en cas d'ingestion unique. Comment définir la dose de sécurité métabolique ? Selon CHILDS elle correspond à la quantité d'alcool ne saturant le système ADH que pendant 15 p. 100 des 24 h. Même en une seule prise à jeun, cette dose provoque une alcoolémie maximale de 0,4 g p. 1 000 qui n'entraîne pas de troubles fonctionnels sérieux mais engendre un agréable état euphorique. Chez le sujet de 70 kg, cela correspond à 1/4 de l de vin. Les normes de sécurité choisies par CHILDS peuvent paraître excessives. Avec TREMOLIÈRES (Groupe vin et nutrition, 1973), on peut admettre que la dose de 28 g d'alcool à chaque repas n'entraîne pas de troubles cliniques. Cela représente environ 1/4 de l de vin trois fois par jour pour un homme de 70 kg.

En conclusion, l'alcool, qui confère au vin la quasi-totalité de sa valeur énergétique, est aussi le facteur qui en limite l'usage. Tout excès mettant en œuvre les voies enzymatiques latérales entraîne à la longue de graves désordres métaboliques. Pour une même quantité consommée, le rythme de l'ingestion revêt une grande importance. Le vin que l'on consomme traditionnellement aux repas, donc à doses fractionnées, permet certainement une meilleure épuration de l'alcool par la voie hépatique normale.

Originalité de certains effets du vin

L'alcool fut longtemps considéré comme le seul constituant du vin exerçant une action physiologique notable sur l'organisme humain. Actuellement, il demeure, certes, un pôle d'attraction obligatoire, en raison de son abondance et de ses effets tout à fait particuliers. Mais il serait bien extraordinaire que, parmi les très nombreuses substances qui l'entourent, aucune ne soit douée du moindre effet physiologique. En fait, l'entourage de l'alcool, mieux connu de jour en jour, confère au vin un ensemble de propriétés biologiques intenses et variées, qui contribuent à son originalité et l'individualisent nettement parmi les autres boissons fermentées. Nous nous bornerons à citer trois résultats expérimentaux pour illustrer cette opinion.

Vin et alcool

FABRE *et al.* (1950) étudient chez le cobaye la toxicité comparée du vin et de son eau-de-vie. Il établit tout d'abord la dose de vin rouge provoquant par ingestion chez l'animal une ivresse comateuse sans issue fatale. Ce vin est ensuite distillé, et l'eau-de-vie obtenue est diluée au même titre alcoolique que le vin. Si l'on fait ingérer aux cobayes la quantité de cette dilution correspondant à la dose de vin précédemment déterminée, on observe 30 p. 100 de morts brutales en cours d'ingestion. Les survivants sont frappés d'un syndrome toxique très grave. L'auteur en conclut que le vin renferme des substances qui diminuent la toxicité de l'alcool et pense que les tannins ne sont pas étrangers à ce pouvoir antidotique.

De son côté, FLANZY, au cours de plusieurs séries d'expériences menées en collaboration avec CAUSERET (FLANZY et CAUSERET, 1952, 1965), PUISAIS et COMBESCOT (FLANZY *et al.*, 1965) étudie les effets du vin rouge et de son eau-de-vie sur la courbe de croissance du rat. Pour des doses identiques d'alcool, le vin ne provoque aucun effet toxique, alors que l'eau-de-vie retarde la croissance et entraîne diverses lésions anatomiques. L'influence des tannins est à nouveau évoquée, car le développement pondéral des animaux s'avère plus rapide chez le lot recevant un vin de macération riche en polyphénols. Toutes précautions avaient été prises au cours de ces travaux pour éliminer l'influence des substances exogènes, le SO_2 en particulier.

On ne peut donc plus confondre sans mauvaise foi, le vin avec une dilution alcoolique. Mais comment expliquer la moindre toxicité de l'alcool bu sous forme de vin? On ne peut invoquer la réplétion gastrique, le facteur de dilution, puisque les volumes ingérés sont identiques. Tout se passe comme si le vin évitait la mise en œuvre des dangereuses voies enzymatiques de secours, en empêchant la saturation du système ADH, autrement dit, en ralentissant l'afflux de l'alcool dans le sang. On peut, avec FABRE et FLANZY, soupçonner l'intervention des tannins, qui, se fixant sur les muqueuses digestives, retardent la résorption de l'alcool. On sait en effet, que chez le rat, les vins blancs ou les vins vinifiés en blanc, produisent une flèche d'alcoolémie plus haute que celle des vins rouges de même titre. La teneur en tannin influe donc sur l'alcoolémie et semble devoir expliquer la différence de toxicité.

Propriétés antiseptiques

Les propriétés antimicrobiennes du vin, connues et utilisées empiriquement depuis l'antiquité furent tour à tour attribuées à l'alcool, au tannin, à l'acide lactique. Depuis 1951, notre laboratoire s'est attaché à l'étude de ce phénomène, envisagé sous divers aspects par LANCEPLEINE, 1950; JENSEN, 1954; MASQUELIER et JENSEN, 1953; COMBEUIL, 1953; DELAUNAY, 1964; MASQUELIER et DELAUNAY, 1965. Nous avons tout d'abord reconnu que le vin produisait une action bactéricide vraie, donc irréversible, et très intense : le bacille d'Eberth, les salmonelles, le colibacille, les staphylocoques pathogènes introduits dans un vin rouge sont tués en quelques minutes. Le vin dilué au demi et même au quart demeure bactéricide, à condition de prolonger suffisamment le temps de contact.

Une expérience simple et démonstrative nous a permis de mieux cerner le mécanisme de cette action. Après avoir vérifié le pouvoir bactéricide d'un vin rouge sur *Escherichia coli*, on agite ce vin pendant 5 min avec du charbon végétal. Après cette centrifugation, on obtient un surnageant incolore. Ce surnageant a

perdu toute activité sur le colibacille, il devient même un bon milieu de culture pour ce germe. Or, ce liquide a conservé la plupart des constituants auxquels on attribuait autrefois le pouvoir antibactérien, et le pH lui-même ne varie que d'un dixième d'unité. En revanche, les polyphénols ont disparu et se trouvent fixés au charbon. C'est sans doute parmi eux qu'il faut chercher les principes bactéricides. Effectivement, le fractionnement du bloc polyphénolique nous a conduit à caractériser deux groupes de constituants bactéricides : les anthocyanes, qui agissent principalement à l'état d'aglucones sur les bactéries gram négatives et les acides hydroxycinnamiques, qui exercent leur pouvoir sur les germes gram positifs. Parmi le second groupe, l'acide paracoumarique mérite une mention spéciale, en raison de la forte activité et de son taux majoritaire. Peu toxique, ce produit a été introduit en thérapeutique ophtalmologique à la suite de ces travaux. Il semble responsable du maintien des propriétés antiseptiques au cours du vieillissement du vin rouge. Souvent combiné, sous forme d'ester, aux anthocyanes du raisin, il se trouve peu à peu libéré à mesure que se dégrade l'édifice anthocyanique.

En 1892, lors d'une épidémie de choléra sévissant à Vienne, un médecin autrichien, Aloïs PICK, eut le courage d'expérimenter sur lui-même l'effet bactéricide du vin envers le vibrion cholérique : de l'eau polluée par une culture de ce germe fut consommée impunément, après avoir été mélangée avec un tiers de vin (PICK, 1892). Cet exemple illustre l'intérêt des propriétés antimicrobiennes du vin dans le cadre de l'hygiène alimentaire. En période épidémique, l'eau et les fruits consommés crus sont à l'origine de contaminations fréquentes par les germes pathogènes d'origine intestinale. En ce cas, le vin peut devenir un auxiliaire précieux de la lutte anti-infectieuse. Sur un plan plus général, il est important de souligner que le vin, pratiquement seul parmi les boissons alcoolisées possède un pouvoir antiseptique capable de compenser le phénomène de sensibilisation aux infections bactériennes engendré par l'alcool (LOURIA, 1971; MAC FARLAND, 1963). Enfin, l'inactivation de divers virus pathogènes par le vin a fait l'objet de récents travaux (KONOWALCHUK et SPIERS, 1976). Ici encore, les constituants polyphénoliques semblent concernés.

Effets vasculaires

Voici encore un exemple d'antagonisme entre le vin et l'alcool. L'ingestion d'éthanol provoque une vasodilatation périphérique, et cet afflux sanguin en surface du corps procure la fausse impression de réchauffement. En réalité, le sujet ne se réchauffe qu'en surface et sa température intérieure s'abaisse par perte calorique cutanée. Or, certains constituants du vin présentent la propriété diamétralement opposée : ils augmentent la résistance des petits vaisseaux capillaires, ce qui évite toute diffusion sanguine exagérée dans les tissus.

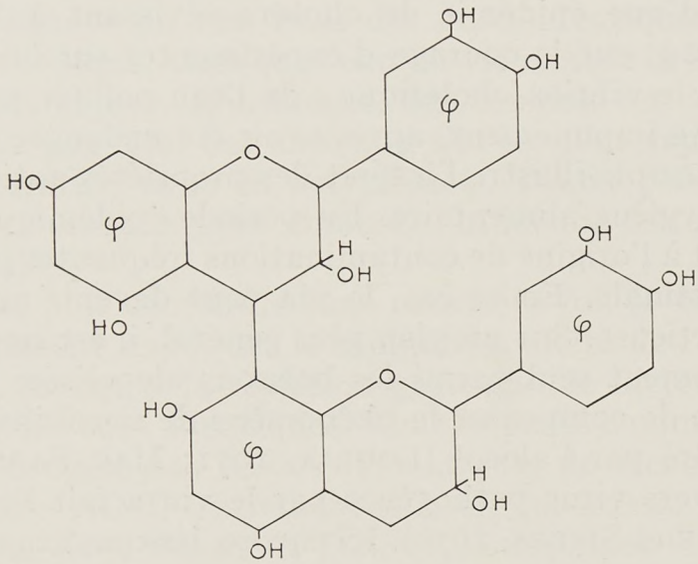
L'expérience de Lavollay

LAVOLLAY et SEVESTRE (1944) montrent que le vin rouge, administré *per os* au cobaye, produit une élévation rapide et prolongée de la résistance capillaire (R.C.). Soupçonnant l'intervention des polyphénols dans ce phénomène, ils injectent à leurs animaux le produit résultant de l'épuisement d'un vin rouge par l'acétate d'éthyle. Cette fois encore, la R.C. se trouve accrue. Les auteurs en déduisent que le vin renferme des substances qui, administrées au cobaye *per os* ou par voie parentérale, renforcent la résistance des capillaires, à la façon de la vitamine P.

A cette époque, la biochimie des constituants polyphénoliques du raisin et du vin était à peine ébauchée. On savait simplement que le vin rouge renfermait des colorants dérivés des flavonols et des anthocyanidols, ainsi que des catéchines, ce dernier terme ne préjugeant nullement de la nature moléculaire des substances actuellement désignées de la sorte. Toutefois, la solubilité dans l'acétate d'éthyle des principes étudiés par LAVOLLAY nous renseigne suffisamment sur leur nature : il s'agissait des constituants que nous classons actuellement parmi les hydroxyflavanols.

Les hydroxyflavanols du vin

Ils proviennent des tissus ligneux de la grappe et surtout des pépins. Leur ensemble constitue la « matière tannique ». Ce sont des édifices moléculaires résultant de l'assemblage d'un certain nombre d'unités monomères de type catéchine.



PROCYANIDOL

FIG. 2. — *Formule du procyanidol.*

Dans le cas du raisin, la (—)-épicatéchine (tétrahydroxy-5.7.3′4′ flavanol 3) se trouve majoritaire au sein des structures ainsi élaborées. A partir du dimère (fig. 2), le chauffage en milieu acide minéral libère du cyanidol, ce qui justifie l'ancienne dénomination de leucocyanidol et celle, plus récente de procyanidol, appliquées à ces substances.

Des procédés d'extraction (MASQUELIER *et al.*, 1965), de synthèse (MICHAUD et MASQUELIER, 1968) et de marquage radioactif (LAPARRA *et al.*, 1973) ont été mis au point dans notre laboratoire, ce qui a rendu possible l'étude pharmacologique des hydroxyflavanols du raisin chez l'homme et chez l'animal.

Chez l'homme, les oligomères flavanoliques sont administrés *per os* à des doses variant de 20 à 100 mg par 24 h. Tous les syndromes dus à une fragilité capillaire excessive constituent les indications majeures : hématomes et ecchymoses spontanées, varices, oedèmes des membres inférieurs, hémorroïdes, accidents hémorragiques de la sphère ophtalmologique. Leur emploi à titre préventif est indiqué dans la rétinopathie diabétique et les manifestations cérébrales de l'hypertension artérielle. L'absence de toxicité et la parfaite tolérance permettent une thérapeutique prolongée.

Chez l'animal, ces mêmes substances rendues radioactives par culture de plants de vigne en atmosphère de $^{14}CO_2$, ont été administrées *per os* et par voie parentérale, en vue de leur étude pharmacocinétique. Chez le rat, la mesure de la radioactivité sanguine après administration buccale montre une absorption extrêmement rapide au niveau de la muqueuse intestinale : 10 min après l'ingestion, le sang est radioactif. Ce résultat s'oppose à l'opinion généralement admise, selon laquelle les « tannins » ne franchissent pas la paroi digestive. La bile, recueillie par fistule du cholédoque, devient, elle aussi, rapidement radioactive, ce qui prouve l'élimination de ces dérivés par voie biliaire. Chez la souris, la localisation tissulaire des oligomères fournit de solides arguments sur le mode d'action de ces substances. La figure 3 montre l'autoradiographie d'une coupe sagittale de souris entière, obtenue selon la technique de COHEN et DELASSUE (1959). Toutes les zones blanches sont radioactives.

L'animal ayant été sacrifié 3 h après l'ingestion du produit, on constate la rapide dispersion des oligomères dans l'organisme, avec une particulière affinité pour les tissus riches en mucopolysaccharides et en collagène : paroi de l'estomac, peau, cartilage (noter les cartilages intervertébraux). D'autres coupes montrent

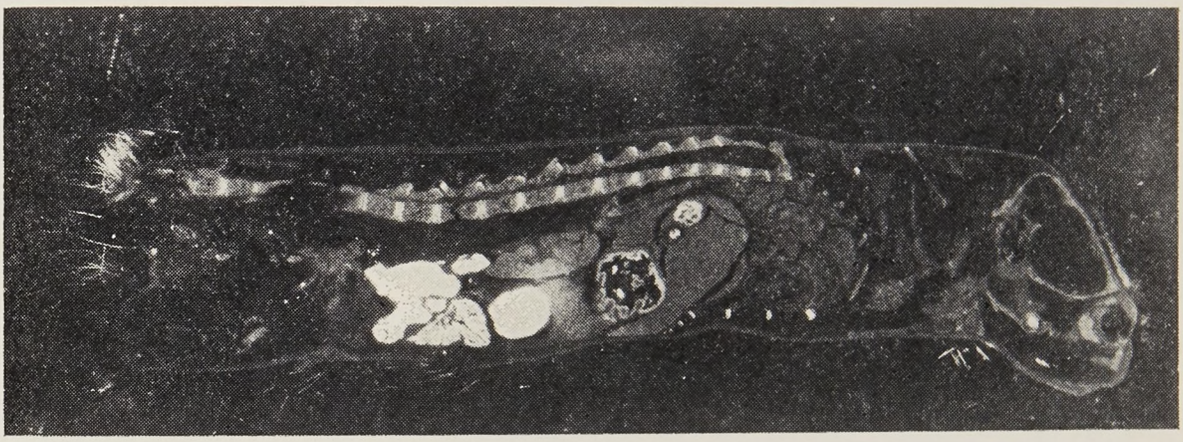


FIG. 3. — *Autoradiographie d'une coupe sagittale de souris entière.*

une fixation élective sur les parois des gros troncs artériels. Ceci renforce l'hypothèse qui attribue aux flavanols le rôle de cofacteur de l'acide ascorbique, la vitamine C étant elle-même impliquée dans la biosynthèse du collagène et des polysaccharides responsables de la résistance des vaisseaux capillaires.

En ce qui concerne le vin ces notions revêtent une grande importance. Pratiquement dépourvu d'acide ascorbique, le vin apporte en revanche à notre régime alimentaire tout ce qui convient à l'économie et à l'activation de la vitamine C. La consommation même très modérée d'un vin rouge de qualité suffit à maintenir notre organisme à l'abri de toute carence en vitamine P. Ainsi se trouvent protégés 200 millions de vaisseaux capillaires, soit une longueur de plusieurs centaines de kilomètres, sillonnés sans arrêt par 20 000 milliards de globules rouges !

Conclusion

Parmi les boissons fermentées, le vin occupe une place tout à fait particulière, en raison de la variété et de l'originalité de ses constituants non alcooliques. C'est, en somme, la forme stable d'une denrée périssable : le raisin. Cette stabilité, née du

processus fermentatif, assure la pérennité de multiples substances qui ne peuvent subsister qu'en milieu hydroalcoolique acide et réducteur. Nous avons décrit les effets physiologiques les plus caractéristiques de ces constituants. Mais l'alcool, lui aussi, demeure, avec tous les dangers que sa présence implique au plan de la nutrition.

Quelles sont les motivations avouées par les consommateurs de boissons alcoolisées? Un sondage récent (I.F.O.P., 1974) nous apprend que la soif fait choisir de préférence la bière ou le cidre. Les apéritifs et les liqueurs répondent au besoin de stimulation et se consomment aussi par politesse, « pour faire comme tout le monde ». Quant au vin, 87 p. 100 des interrogés s'accordent pour le considérer comme l'accompagnement habituel de la nourriture. Curieusement, personne n'évoque le besoin d'un euphorisant, d'un tranquillisant. Et pourtant, cette motivation est sous-jacente dans la plupart des cas. Mais la réprobation sociale envers la drogue rend inavouable un tel penchant.

Bien que la consommation nationale régresse, les Français restent fidèles au vin, puisque 91 p. 100 des foyers en consomment, avec une préférence de plus en plus nette pour un produit de qualité. L'hygiéniste ne peut qu'encourager une telle tendance : boire moins et meilleur. Toutefois, la qualité commerciale repose presque uniquement sur des critères gustatifs et organoleptiques. La qualité nutritionnelle exige en outre que les constituants utiles à la santé soient préservés et que toute surcharge alcoolique inutile soit évitée. C'est à l'œnologue qu'échoit la mission d'harmoniser ces deux points de vue, que nous estimons pour notre part tout à fait conciliables.

Summary

Wine and nutrition

The value of wine in the diet should be the first consideration when wine is examined from a nutritional point of view. Since wine conforms to energy toxicological, psychosensorial and socio-economical criteria, it can be classified as a food. However the problem of alcohol is involved and can only be resolved by limiting the consumption of wine to a level where the danger of hepatic damage from alcohol is not incurred.

Certain characteristic biological properties of wine may be attributed to the presence of alcohol: a higher tolerance of wine itself, the antiseptic properties and vascular effects. Vascular effects may also be attributed to the flavonolic digomers which make wine a rich source of vitamin P.

Drinking a moderate quantity of quality wine with meals is beneficial to the general well-being of both the body and mind. Unfortunately the margin between use and abuse is very narrow and requires each consumer to exercise vigilance.

Key-words: *Wine — Food value — Alcohol — Vitamine P — Biological effects.*

Références bibliographiques

Childs A. W. Communication personnelle.
Cohen G., Collins M., 1970. *Science*, **167**, 1749-1751.
Cohen Y., Delassue H., 1959. *C. R. Soc. Biol.*, **153**, 300-304.
Combeuil G., 1958. *Thèse Doctorat Univ.* (Pharmacie), Bordeaux.
Delaunay D., 1964. *Thèse Doctorat Univ.* (Pharmacie), Bordeaux.
Fabre R., Rougier G. Rougie J., 1950. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, 1498-1499.
Flanzy M., Causeret J., 1952. *Ann. Technol. Agr.*, **1**, 227-240.

FLANZY M., CAUSERET J., 1965. Effets physiopathologiques des vins, Monographie, *INSERM n° 32*, Paris, 169-172.

FLANZY M., PUISAIS J. COMBESCOT C., 1965. *Ann. Technol. Agr.*, **14**, 263-274.

Groupe Vin, Nutrition, 1973. *Cahiers Nutr. Diét.*, **8**, supplt au facis. 2.

I. F. O. P., Enquête Septembre 1974, *Cahiers de l'I. R. E. B.*, 1975, **1**, 7-19.

JENSEN H., 1954. *Thèse Doctorat Univ.* (Pharmacie), Bordeaux.

KONOWALCHUK J., SPIERS J. L., 1976. *Appl. and Envir. Microbiol.*, **32**, n° 6, 718-719.

LANCEPLEINE J., 1950. *Thèse Doctorat Univ.* (Pharmacie), Bordeaux.

LAPARRA J., MICHAUD J., LESCA M. F., BLANQUET P., MASQUELIER J., 1973. *C. R. Acad. Sc.*, **276** D, 2847-2850.

LAVOLLAY J., SEVESTRE J., 1944. *C. R. Acad. Agric.*, **30**, 259-260.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1).

Table des matières

SYMPOSIUM INTERNATIONAL D'ŒNOLOGIE
BORDEAUX 21-25 JUIN 1977

Les conditions naturelles et humaines de la qualité des vins

CRÉATION ET MAINTIEN DES VIGNOBLES DE QUALITÉ

R. PIJASSOU. — Les conditions historiques et géographiques de la naissance des grands crus au XVIIIe siècle 3
H. P. OLMO. — Évolution des variétés cultivées pour la production de vin en Californie 15
I. ALSAIDI. — *La vigne et le vin en Irak* (*intervention*) 27
S. PIMENTEL. — Le vignoble et le vin de Porto 31
S. TEODORESCU. — Les vignobles et les vins de Roumanie 41
D. DAVIDESCU. — *Teneur en oligoéléments des vins roumains en relation avec les zones écologiques* (*intervention*) 53
A. HUETZ DE LEMPS. — Les conditions de développement du vignoble de la Rioja (Espagne) 55
R. HERNANDEZ. — *Relation entre les propriétés d'oxydation du moût et la qualité du vin de la Rioja* (*intervention*) 69
G. G. VALOUIKO. — Vignobles et vins d'URSS 71
G. SEGUIN. — L'alimentation en eau de la vigne et son influence sur la composition des moûts 81
C. LOINGER. — *Relations entre l'alimentation en eau de la vigne et la composition des moûts dans les vignobles israéliens* (*intervention*) 93
J. BRANAS. — Bases biologiques et agronomiques de la qualité des vendanges 99
P. POUGET. — Le cépage et le porte-greffe, facteurs importants de la qualité des vins 111
J. MADERO-TAMARGO, G. DARNE et J. BOUARD. — *Influence de l'irrigation sur la composition en acides gras et en composés phénoliques des mérithalles, des feuilles et des inflorescences de la vigne au moment de la floraison* (*intervention*) 123
L. HIDALGO. — La pourriture des raisins. Moyens de protection et influence sur la qualité des vins 127
J. C. SAPIS. — *Modification du raisin parasité par* Botrytis Cinerea *et par différents micro-organismes* (*intervention*) 137
J. N. BOIDRON. — *Relation entre les substances terpéniques et la qualité du raisin* (*Rôle de* Botrytis Cinerea) (*intervention*) 141

TECHNIQUES DE VINIFICATION ET DE CONSERVATION DES VINS DE QUALITÉ

A. M. MAYER. — Les oxydases des raisins et des vins 149
G. MARTEAU (†) présenté par R. CORDONNIER. — Maîtrise des activités enzymatiques au cours des phénomènes préfermentaires 161
G. WÜRDIG. — La correction de l'acidité du moût et du vin 173
S. P. AVAKIANTS. — *Les facteurs biochimiques de la formation de vins mousseux* (*intervention*) 185
B. C. RANKINE. — Acquisitions récentes dans la sélection et l'utilisation des souches de levures pures en œnologie 189
Mme S. SIKOVEC. — *Observations concernant l'incidence des levures sèches sur la qualité des vins* (*intervention*) 201
F. RADLER. — Les activateurs du développement anaérobie de la levure 203

Mme S. LAFON. — *Les stéroïdes « facteurs de survie » des levures au cours de la vinification (intervention)* 215
Mme A. MANTACHIAN. — *Certains aspects du métabolisme de la proline par les levures du vin (intervention)* 219
H. HAUSHOFER. — Élaboration et conservation des vins blancs aromatiques 221
A. BERTRAND. — *Influence du débourbage et de la température de fermentation sur les teneurs en substances volatiles des vins blancs (intervention)* 231
J. G. OTT. — *Influence de la teinte du verre sur l'évolution du vin en bouteilles (intervention)* 235
G. MARGHERI. — Évolution de la couleur des vins au cours de leur conservation et de leur vieillissement 239
Y. GLORIES. — *Caractérisation des différentes fractions constitutives des composés phénoliques du vin rouge, leurs propriétés œnologiques (intervention)* 253
C. CANTARELLI. — *La qualité des vins rouges issus du procédé de macération mécanique (intervention)* 257
L. USSEGLIO-TOMASSET. — Acquisitions récentes sur les phénomènes colloïdaux dans les vins 261
D. DUBOURDIEU. — *La production par* Botrytis Cinerea *d'un glucane responsable des difficultés de clarification de certains vins issus de raisins pourris (intervention)* 275
J. FARKAŠ. — Les agents de stabilisation biologique des vins 279
L. SHCHERBANOVSKI. — *Rôle des substances végétales comme agents de la stabilisation biologique des vins et des boissons (intervention)* 289
J. MASQUELIER. — *Sur la toxicité de l'acide 5-Nitrofurylacrylique (5 NFA) (intervention)* 291
P. BIDAN, C. DUBOIS, G. DOUTSIAS. — Les problèmes théoriques et pratiques de la stabilisation biologique des vins par les procédés thermiques 293
M. DEVEZE. — *Quelques problèmes de la stabilisation biologique des vins doux par la chaleur (intervention)* 315
K. WÜCHERPFENNIG. — Possibilité d'application de procédés utilisant des membranes pour la stabilisation des vins (ultrafiltration, osmose inverse, électrodialyse) 319
H. MÜLLER-SPATH. — *Un nouveau procédé de prévention des précipitations de bitartrate de potassium : « le procédé de contact » (intervention)* 333

DÉFINITION ET APPRÉCIATION DE LA QUALITÉ

E. PEYNAUD. — Les critères de la qualité des vins. 337
P. SUDRAUD. — *Évolution des taux d'acidité volatile depuis le début du siècle (intervention)* 349
J. PUISAIS. — Le contrôle organoleptique de la qualité : Techniques de dégustation . . . 351
F. DRAWERT, P. SCHREIER. — Caractérisation des raisins et des vins à l'aide de certains constituants remarquables 367
F. A. COLACO DE ROSARIO. — *La caractérisation des vins, base essentielle de la délimitation des zones de production (intervention)* 377
P. MARTINIÈRE, M. GAULTIER, J. SEVERAC, P. SUDRAUD et J. L. CAUSSANEL. — *Détermination du millésime des vins en Gironde par la mesure de la radioactivité du carbone 14 (intervention)* 381
J. F. SCHOPFER. — La rémanence des produits de traitement viticole antifongique et leur influence sur la vinification 383
O. COLAGRANDE et V. MAZZOLENI. — *Résidus de 2 imidazoline thione dans les moûts et les vins (intervention)* 395
P. RIBÉREAU-GAYON et Mme A. LONVAUD-FUNEL. — Le gaz carbonique dans les vins tranquilles, son incidence organoleptique 399
A. D. WEBB. — Application de la chromatographie en phase gazeuse au contrôle analytique des vins 411
Mlle D. CABEZUDO. — *Colonnes de phase mixte pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des fermentations alcoolique et acétique (intervention)* 421
A. RAPP et H. HASTRICH. — *Application de la chromatographie en phase gazeuse à la caractérisation des variétés (intervention)* 423
J. MASQUELIER. — Vin et nutrition 427

Les Annales de Technologie agricole figurent dans Current Contents

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (1).

Contents

CREATION AND MAINTENANCE OF QUALITY WINE

R. PIJASSOU. — Historical and geographical conditions of the rise of the " Grands crus " in the eighteenth century 3
H. P. OLMO. — Evolution of cultivated wine varieties in California 15
I. ALSAIDI. — *The vineyard and wine in Iraq* 27
E. SERPA-PIMENTEL. — The Porto vineyard and wines 31
S. C. TEODORESCU. — The Rumanian vineyards and wines 41
D. DAVIDESCU. — *Percentage of oligoelements in Rumanian wines in different ecological zones* 53
A. HUETZ DE LEMPS. — The conditions for the Rioja Spain vineyard development 55
R. HERNANDEZ. — *Relation between the capacity of oxydation of must and the quality of Rioja wine* 69
G. G. VALOUIKO. — Vineyards and wines of the U.S.S.R. 71
G. SEGUIN. — The water intake system of the vine and its influence on the chemical composition of the musts 81
C. LOINGER. — *Relations between the water supply to the vineyard and the composition of must in Israelian vineyards* 93
J. BRANAS. — Biological and agronomical date for the quality of grape larvest 99
R. POUGET. — Vine variety and rootstock as major factors of the wine quality 111
J. MADERO-TAMARGO, G. DARNE et J. BOUARD. — *Irrigation and its influence on the fat acids and phenolic components composition of the internodes the leafs and inflorescences of vine during efflorescence* 123
L. HIDALGO. — Grape rot: control means and influence on the wine characteristics 127
J. C. SAPIS. — Modification of grapes affected by Botrytis cinerea and by different microorganisms 137
J. N. BOIDRON. — *Relation between terpenic substances and the grapes quality (role of* Botrytis cinerea) 141

TECHNIQUES OF VINIFICATION AND CONSERVATION OF QUALITY WINE

A. M. MAYER. — Grape and wine oxidases 149
G. MARTEAU (†). — Control of enzyme activity during the prefermentation phase 161
G. WÜRDIG. — Correction of the must and wine acidity level 173
S. P. AVAKIANTS. — *The biochemical factors in the formation of sparkling wines* 185
B. C. RANKINE. — Progress in the selection and use of pure yeasts in oenology 189
S. SIKOVEC. — *Observations concerning the incidence of dry yeasts on the wine quality* 201
F. RADLER. — Promotors of the yeast anaerobie growth 203
S. LAFON. — *The steroids as survival factors of yeasts during vinification* 215
A. MANTACHIAN — Some aspects of prolin metabolism by wine yeast 219
H. HAUSHOFER. — Production and conservation of the aromatic white wines 221
A. BERTRAND. — *Influence of debourbage and of fermentation temperature on the volatile tenor of white wines* 231
J. G. GOTT. — *Influence of the glass colour on the wine evolution in the bottle* 235
G. MARGHERI. — Evolution of the wine colour during conservation and ageing 235
Y. GLORIES. — *Characterization of the different constituent fractions of the phenoloc components of red wine. Their oenological properties* 253

C. Cantarelli. — *The quality of red wine produced by mechanical maceration* 257
L. Usseglio-Tomasset. — *Progress about colloidal phenomenons occuring in musts and wines* 261
D. Dubourdieu. — *Botrytis cinerea as a producer of a glucane responsible of the clarification difficulties in certain wines made of rotten grapes* 275
J. Farkaš. — Wine biological stabilizers 279
L. Shcherbanovski. — *The role of vegetable substances in the biological stabilization of wine and other drinks* 289
J. Masquelier. — *The toxicity of 5-NFA* 291
P. Bidan, C. Dubois and G. Doutsias. — Theoretical and practical difficulties of the wine biological stabilization with heat treatments 293
M. Deveze. — *Some problems of the biological stabilization of sweet win by heat* 315
K. Wücherpfennig. — Possible applications of procedures utilizine membranes for the stabilization of wines (ultra filtration, inverse osmosis, electrodialysis) 319
H. Müller-Spath. — *A new procedure to prevent precipitations of potassium acid tartrate, the contact procedure* 333

DEFINITION AND APPRECIATION OF QUALITY

E. Peynaud. — The criteria of the quality of wine 337
P. Sudraud. — *Evolution of the volatile acid ratio since the beginning of this century* 349
J. Puisais. — The organoleptic quality control: techniques and tasting 351
F. Drawert and P. Schreier. — Characterization of the grapes and wines by certain typical fractions 367
F. A. Colaco de Rosario. — *The wine characterization as essential basis of delimiting production zones* 377
P. Martiniere, M. Gaultier, J. Severac, P. Sudraud and J. L. Caussanel. — *Determination of the vintage of the Gironde wines by measure of the carbon 14 radioactivity* 381
J. E. Schopfer. — The remanence of fungicides and their influence on vinification 383
O. Colagrande and V. Mazzoleni. — *Residues of 2 imidazolidine thione in the wine musts* 325
P. Ribereau-Gayon and A. Lonvaud-Funel. — Carbon dioxide in wine and its organoleptic incidence 399
A. D. Webb. — The application of gas chromatography on the analytical control of wine 411
Mlle D. Cabezudo. — *Mixed phase column in analysis by gas chromatography of alcoholic and acetic fermentation products* 421
A. Rapp and H. Hastrich. — *Application of gas chromatography to the characterization of the different varieties* 423
J. Masquelier. — Wine and nutrition 427

annales de technologie agricole

Trimestriel

1978

Vol. 27 - N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 441-454.

Méthode de référence pour la mesure de l'activité de l'eau dans les produits alimentaires

H. BIZOT et J. L. MULTON

Laboratoire de Biophysique des Aliments,
Centre de Recherches de Nantes, I.N.R.A.,
Chemin de la Géraudière, 44072 Nantes Cedex

Résumé

L'activité de l'eau (a_w) est définie et son importance vis-à-vis de l'aptitude au stockage des produits alimentaires est soulignée.

Une méthode de détermination de l'a_w dans les aliments basée sur la mesure de la pression de vapeur d'eau a été étudiée afin d'évaluer son application en tant que référence pour les autres méthodes pratiques couramment utilisées.

Dans le montage réalisé, un manomètre à huile sert à mesurer la pression de vapeur d'eau en équilibre avec le produit, qui est maintenu à une température constante et connue. L'appareillage, le mode opératoire et l'étude critique sont détaillés.

Le calcul d'erreur et les études de répétabilité permettent d'évaluer la précision à ± 0,01 unité d'a_w à 20 °C. Les résultats sont un peu plus dispersés dans le cas des produits solides que dans celui des liquides.

Mots clés : *eau, activité, aliments, méthode de référence.*

I. — Introduction

L'eau est un constituant essentiel des aliments, non seulement d'un point de vue pondéral, mais surtout en tant qu'agent réactionnel très polyvalent et milieu de diffusion privilégié des réactants de nombreuses réactions biochimiques.

L'eau conditionne en particulier la vitesse des réactions enzymatiques (Drapron, 1972), de l'oxydation des lipides (Karel, 1975), de la dénaturation des protéines (Multon et Guilbot, 1975), des brunissements non enzymatiques (Loncin *et al.*, 1965), des développements microbiens (Corry, 1973; Leistner et Rödel, 1976) et détermine la plupart des propriétés physiques des aliments (propriétés rhéologiques, électriques, transferts de chaleur, rétention d'arôme, par exemple).

Son rôle dans les processus technologiques de préparation, de transformation et de conservation des produits alimentaires, notamment de ceux dits « aliments à humidité intermédiaire » est donc prépondérant (DUCKWORTH, 1975; BIZOT *et al.*, 1977).

La maîtrise de ces processus exige que l'on puisse mesurer l'état thermodynamique de l'eau dans le produit, état dont les courbes de sorption et de désorption de la vapeur d'eau ne donnent qu'une vue macroscopique très globale (MULTON, 1977) traduisant la relation d'équilibre qui existe entre la teneur en eau du produit d'une part, et l'humidité relative (H.R.) de l'atmosphère qui l'entoure d'autre part.

Rappelons que l'H.R. est définie (AFNOR, 1972; OMM, 1966) comme étant le rapport du titre molaire x (ou de la pression p) de la vapeur d'eau dans l'air, au titre molaire x (ou à la pression saturante p') de l'air saturé à la même température :

$$\text{(1)} \qquad \text{H.R.} = \left(\frac{x}{x'}\right)_{\text{T}} \times 100 = \left(\frac{p}{p'}\right)_{\text{T}} \times 100$$

sous réserve que x reste inférieur à x', ce qui exclut le cas des brouillards.

Le terme d'H.R.E. (Humidité Relative d'Equilibre) est souvent employé pour rappeler qu'il s'agit de l'état d'équilibre du système (LONCIN, 1976). Il est, de plus, fréquent de voir utiliser l'un pour l'autre les termes d'H.R.E. et d'activité de l'eau a_w (*) car ils sont tous deux caractéristiques d'un produit. Cependant l'H.R.E. est généralement exprimée sur une échelle variant de 0 à 100 p. 100, alors que l'a_w varie entre 0 et 1.

En effet l'a_w est reliée par définition à la variation du potentiel chimique de l'eau. Cette variation s'exprime dans le cas de l'eau considérée comme gaz réel par :

$$\text{(2)} \qquad \mu_w(\text{T, P}) - \mu'_w(\text{T, P}) = \text{RT Log}\,\frac{f_w}{f'_{\text{T}}}$$

où μ'_w(T, P) est le potentiel chimique de *l'eau pure* liquide à la température T et à la pression totale P (état de référence),

μ_w(T, P) le potentiel chimique de *l'eau dans le milieu* étudié à la même température et à la même pression totale,

f_w la fugacité de l'eau dans le milieu,

et $f'_{(\text{T})}$ la fugacité de l'eau pure à la température T et à la pression totale P,

R la constante des gaz parfaits,

et T température absolue (°K);

l'activité de l'eau est définie par le rapport $a_w = \dfrac{f_w}{f'_{\text{T}}}$.

Dans le domaine des faibles pressions de vapeur d'eau qui nous concerne ici les fugacités s'identifient aux pressions partielles de vapeur d'eau.

La relation de définition est donc :

$$\text{(3)} \qquad \frac{p_w}{p'_{\text{T}}} = \frac{f_w}{f'_{\text{T}}} = a_w = \frac{\text{H.R.E. (p. cent)}}{100}$$

(*) a_w : Pour « activity of water », notion introduite par LEWIS et RANDALL (1923).

où p_w est la pression partielle de vapeur d'eau en équilibre avec le produit à la température T.

Bien plus que la teneur en eau, c'est l'a_w qui permet d'évaluer la disponibilité réactionnelle de l'eau dans un produit, en la rapportant à un état de référence qui est celui de l'eau pure à la même température. La connaissance de l'a_w est donc indispensable en technologie alimentaire, afin de mieux maîtriser les réactions où l'eau intervient.

Or s'il est facile de déterminer, à partir des lois de Raoult, l'a_w des solutions idéales, celle des mélanges, surtout en présence d'une phase solide, est pratiquement impossible à prévoir du moins par un calcul rigoureux (Bizot *et al.*, 1977). Le seul moyen d'y parvenir demeure donc la détermination expérimentale.

Plusieurs méthodes de mesure des potentiels chimiques pourraient théoriquement permettre la détermination de l'a_w (Robinson et Stokes, 1959); cependant les mesures électrochimiques et les déterminations des points de congélation et d'ébullition ne sont pas applicables à une phase solide; les mesures des coefficients de partage entre deux solvants non miscibles nécessitent un étalonnage préalable (Mallett *et al.*, 1974).

Les méthodes les plus appropriées au cas des produits alimentaires (mélanges complexes en général solides ou pâteux) sont celles consistant à mettre le produit en équilibre avec l'atmosphère d'une micro-enceinte, puis à déterminer les caractéristiques hygrométriques de l'air ainsi conditionné par le produit. Ces méthodes sont de deux types :

— Indirectes et étalonnées, elles consistent à mesurer une propriété caractéristique d'une autre phase adsorbante en équilibre avec le produit et son atmosphères caractéristiques mécaniques (hygromètre à cheveux ou à fibres), électriques (hygromètre à sonde capacitive ou résistive) ou hydriques (méthodes isopiestiques). Dans tous les cas, ces méthodes nécessitent un étalonnage et leur précision dépend beaucoup des qualités du matériau de référence (hystérésis et cinétique de sorption, sensibilité à la température et aux contaminations par exemple). Elles sont donc limitées à des usages pratiques (Smith, 1971; Toledo, 1973).

— Directes et absolues, elles consistent à mesurer deux caractéristiques d'état de l'air en équilibre avec le produit (Wexler et Ruskin, 1965) : d'une part la température sèche, d'autre part la pression de vapeur d'eau (méthode manométrique), ou la température de rosée (méthode hygrométrique), ou la température de saturation adiabatique ou du thermomètre humide (psychrométrie) ou l'humidité spécifique (gravimétrie).

Seule la détermination de la pression de vapeur et celle de la température de rosée sont adaptables aux mesures sur de très faibles volumes d'air. Toutefois, les difficultés que nous avons rencontrées dans la mesure de la température de rosée (Bizot, 1976), liées en particulier à l'existence d'un gradient thermique inévitable entre le produit et le miroir réfrigéré, nous ont fait, au moins provisoirement, abandonner cette mesure comme méthode de référence fondamentale.

Par contre, la méthode manométrique nous ayant donné satisfaction, l'objet de cette note est d'en présenter la description et l'étude critique.

Même si quelques auteurs ont déjà utilisé des méthodes manométriques (Taylor, 1961, Labuza *et al.*, 1976) bien des aspects en sont encore insuffisamment précisés. C'est pourquoi nous avons adapté au cas particulier de la mesure de l'a_w des produits alimentaires, la méthode que Laine et Gac (1951) ont décrite pour la mesure absolue de l'H.R. de l'air dans les chambres froides.

II. — Méthode et appareillage utilisé

A. — *Principe de la mesure*

La méthode manométrique de mesure de l'a_w consiste à déterminer directement la pression de vapeur d'eau en équilibre avec le produit, à la température T après avoir éliminé dans le mélange gazeux tous les gaz autres que la vapeur d'eau.

Cette élimination est obtenue soit en congelant le produit dans le récipient de prélèvement et en évacuant par pompage les gaz non condensés (variante 1), soit en effectuant à la température du laboratoire plusieurs pompages successifs, de courte durée (variante 2).

B. — *Matériel et appareillage utilisés* (fig. 1)

Le montage, inspiré de celui de Laine et Gac (1951) met en œuvre le principe de mesure décrit ci-dessus. Il comporte des ampoules porte-échantillon, un dispositif manométrique, un dispositif de mise sous vide, ainsi que les systèmes régulateurs de température.

1. *Ampoules porte-échantillon*

Ces ampoules, d'un volume total de 100 cm³, sont constituées de deux parties reliées par un rodage conique (40/45) du même diamètre que l'ampoule. La moitié supérieure se termine par un robinet et un fin rodage conique (14/23); la pièce de jonction entre les ampoules et le dispositif manométrique comporte un raccord sphérique à joint torique Viton pour éviter la rupture accidentelle de cette partie fragile.

2. *Dispositif manométrique*

Le manomètre proprement dit est constitué d'un tube en U, à paroi épaisse, et de faible diamètre intérieur (5 mm), garni d'une huile spéciale (huile de pompe à diffusion, type Diffelen L, dont la densité à 20 °C est égale à 0,883 et la pression de vapeur de l'ordre de 10^{-7} Torr).

La branche gauche du manomètre comporte une fiole de sécurité à retour automatique permettant de récupérer l'huile en cas de surpression accidentelle, ainsi qu'un robinet de vidange à sa partie inférieure.

Deux ajutages munis d'un robinet et d'un raccord sphérique permettent de connecter les ampoules porte-échantillon au système manométrique.

Une petite cupule est aménagée sur la branche droite du manomètre (fig. 1, en 5) pour recevoir une charge de neige carbonique (point froid).

Les ampoules porte-échantillon et les deux branches du manomètre peuvent être isolées ou mises en relation avec la pompe à vide grâce à plusieurs robinets.

La hauteur de la dénivellation du liquide manométrique entre les deux branches de l'appareil est lue à 0,5 mm près grâce à un réglet mobile.

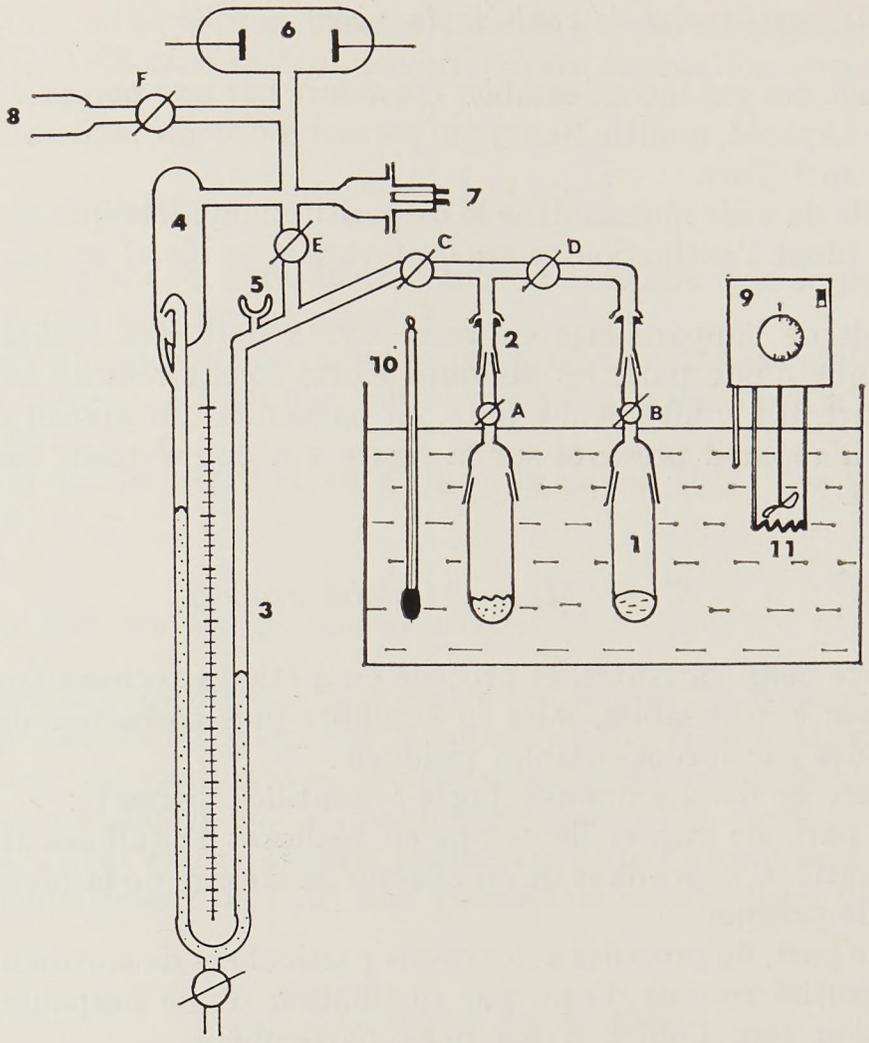


FIG. 1. — *Montage pour la mesure de l'activité de l'eau par la méthode manométrique.*

1 Ampoule porte-échantillon.
2 Jonction par rodage sphérique.
3 Manomètre garni d'huile de pompe à diffusion.
4 Ampoule de garde.
5 Cupule en verre (« point froid »).
6 Tube éclateur.
7 Jauge à vide type Pirani.
8 Connection vers le système de pompage.
9 Thermoplongeur avec sonde Pt : 100 Ohm.
10 Thermomètre au 1/10 °C.
11 Bain thermostaté.

3. *Régulation et mesures des températures*

Les ampoules plongent dans un bain thermostaté dont la température est maintenue constante à ± 0,1 °C près, à l'aide d'une résistance de chauffage commandée par un thermostat à sonde à résistance de platine.

La température du bain et celle de l'échantillon sont mesurées, à 0,1 °C près, à l'aide d'un thermomètre à mercure de précision ou d'une sonde à résistance de platine (100 Ohms).

L'ensemble de l'appareillage est placé dans une pièce ou dans une armoire thermorégulée à ± 1 °C près.

4. *Dispositif de pompage et de contrôle du vide*

Le pompage des gaz incondensables est assuré par une pompe à palette à deux étages (pompe Leybold, modèle BL20) qui permet d'obtenir facilement une pression de l'ordre de 10^{-2} Torr.

Le contrôle du vide obtenu dans le dispositif manométrique est assuré par un tube éclateur (dont l'extinction se produit vers 0,04 Torr) et par une jauge de Pirani.

L'ensemble de l'appareillage en verre Pyrex doit être réalisé avec un soin extrême afin que d'une part, les volumes morts soient réduits au minimum, et que d'autre part, il n'y ait aucune fuite, en particulier au niveau des robinets et des raccords. L'appareil présenté sur la figure 1 a donné toute satisfaction à ce point de vue.

C. — *Mode opératoire proposé*

Il comporte deux variantes, et procède en 4 étapes : échantillonnage, évacuation des gaz non condensables, mise en équilibre puis correction de pression pour tenir compte des gaz incondensables résiduels.

La présence de deux ampoules porte-échantillon permet :

— d'une part, de gagner du temps en réalisant l'équilibre thermique d'un deuxième échantillon, cependant qu'on effectue la mesure de la pression de vapeur régnant dans le premier;

— d'autre part, de procéder à des essais particuliers de sorption ou de désorption d'une quantité connue d'eau, par distillation d'une ampoule dans l'autre; cette application fera l'objet d'une note particulière.

1. *Échantillonnage*

Placer rapidement dans une ampoule porte-échantillon une partie aliquote représentative du produit (prise d'essai de 10 g ou de 100 g respectivement dans le cas de la variante n° 1 et dans celui de la variante n° 2) en évitant toute projection et adhérence sur les parois du tube.

2. *Évacuation*

L'évacuation des gaz autres que la vapeur d'eau peut être réalisée selon l'une des deux variantes suivantes.

Variante n° 1

Placer l'ampoule dans un mélange alcool-carboglace (— 80 °C) pendant environ 30 minutes pour congeler le produit, la pression résiduelle de vapeur d'eau est alors de 4.10^{-4} Torr. Ensuite connecter l'ampoule au système de pompage et évacuer la majeure partie des gaz non condensés jusqu'à une pression résiduelle d'environ 10^{-2} Torr (robinets A, C, E, F ouverts; D fermé).

Variante n° 2

Procéder à l'évacuation partielle de l'atmosphère au-dessus du produit par 4 pompages successifs de 3 secondes chacun, chaque nouveau pompage étant entrepris dès que le circuit de vide atteint de nouveau 10^{-2} Torr après isolement

de l'ampoule (éviter l'ébullition dans le cas des produits liquides); utiliser pour cela le robinet C, A, E et F restant ouverts; après évacuation fermer E et laisser A, C, et F ouverts.

3. *Réalisation de l'équilibre*

— Mettre en place le bain thermostaté et attendre que le produit soit en équilibre thermique à la température T.

— Attendre que la pression indiquée par le manomètre soit stabilisée (environ 1 h 30 pour les liquides, 5 h ou plus pour les solides), noter alors la pression totale indiquée, soit $p_t(T)$.

— Noter la température et en déduire la valeur de la pression de vapeur saturante soit $p'(T)$.

4. *Correction de pression des gaz incondensables*

Isoler la branche droite du manomètre (en fermant le robinet C), placer un peu de mélange alcool-carboglace sur la cupule « point froid »; attendre que toute la vapeur d'eau se trouvant dans la branche droite se soit condensée (environ 5 min) et lire la pression indiquée par le manomètre, soit $p_r(T)$. Cette valeur doit être retranchée à $p_t(T)$ car elle représente la fraction de gaz incondensables à — 80 °C (composés principalement de l'air) non évacués ou restés piégés dans le produit.

D. — *Expression des résultats*

L'a_w du produit est donnée par la relation :

$$a_w = \left(\frac{p_w}{p'}\right)_T = \left(\frac{p_t - p_r}{p'}\right)_T \tag{4}$$

où p_t est la pression totale en équilibre avec le produit après évacuation et réchauffement à la température T.

p_r la pression résiduelle des gaz incondensables mesurée après recongélation, à la même température.

Nota : Les pressions sont exprimées en Torr par conversion de la hauteur de colonne d'huile. Le rapport de conversion, fonction de la température, est à 20 °C de 1 Torr pour 15,3 mm d'huile.

III. — Étude critique

A. — *Erreurs de principe liées à l'appareillage et au mode opératoire*

1. *Pression totale des gaz dans l'appareil*

Dans cette méthode l'a_w d'un produit est déterminée en mesurant la pression de vapeur d'eau en équilibre avec ce produit, sous une pression totale pratiquement

égale à la pression de vapeur d'eau elle-même; GAL (1972) a montré que le résultat rapporté à la pression atmosphérique est pratiquement identique, bien que la vapeur d'eau ne soit pas exactement un gaz parfait.

Cependant les gaz incondensables présents au moment de la mesure ont une influence sur la cinétique de diffusion de la vapeur d'eau; si leur pression est trop importante (supérieure à 2 Torr) le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre peut être allongé, surtout pendant la condensation de l'eau sur le point froid.

2. *Présence de vapeurs condensables en même temps que l'eau*

Si le produit comporte des substances volatiles autres que l'eau, de pression de vapeur similaire et condensables à — 80 °C (alcools tels que l'éthanol, l'éthylène et les propylène glycols) en concentration non négligeable par rapport à celle de la vapeur d'eau, la mesure de l'a_w se trouve entachée d'une erreur par excès. Cependant dans le cas des mélanges binaires, il est possible d'utiliser des équations correctives si l'on connaît la fraction molaire de l'eau dans le mélange (LONCIN, 1976). Ce cas est peu fréquent et il est possible de contrôler la présence de semblables vapeurs par une analyse de chromatographie en phase gazeuse du condensat des vapeurs en équilibre avec le produit. Ce fait constitue la principale limitation de la méthode.

3. *Influence de la congélation et du mode d'évacuation*

Dans le cas de la variante n° 1, la congélation provoque des gradients de pression de vapeur au sein du produit simultanément aux gradients thermiques; il peut en résulter des transferts de vapeur d'eau, soit dans la masse du produit, soit de celui-ci vers les parois du tube au cours de la phase de refroidissement. Ce risque d'erreur est plus important dans le cas des produits présentant un fort phénomène d'hystérésis de sorption, pour lesquels l'état initial peut être modifié même à teneur en eau constante.

Par ailleurs, la congélation peut entraîner la formation de cristaux de glace qui dans certains cas est susceptible de rompre les structures cellulaires, et de modifier l'état de l'eau.

On élimine ces diverses causes d'erreurs en effectuant une congélation rapide, à basse température (— 80 °C), génératrice de petits cristaux; LAINE et GAC (1951), conseillaient la congélation lente dans le cas de la mesure d'une pression de vapeur d'un échantillon d'air pour éviter la précipitation et l'élimination par aspiration de particules de glace condensée autour de fines poussières agissant comme germe (erreur par défaut). Dans le cas de la mesure de l'a_w, cette erreur est rendue négligeable, car les quantités d'eau ainsi perdues sont infimes au regard de la quantité d'eau totale contenue dans l'échantillon.

Pour la même raison, les pertes d'eau résultant du séchage lié aux pompages successifs dans le cas de la variante n° 2 (sans congélation) peuvent être tenues pour négligeables mais à condition de porter la prise d'essai à 100 g (au lieu de 10) et uniquement dans le cas de produits peu divisés, dont la surface d'évaporation est faible. Dans le cas contraire, l'erreur devient rédhibitoire : ainsi par exemple la fécule de pomme de terre (à $a_w \simeq 0{,}60$) montre, entre deux mesures successives, une diminution d'a_w de 0,03 due à l'évaporation de l'eau.

Dans ces conditions, les écarts observés entre les résultats donnés par les deux variantes n'excèdent pas 1 p. 100 en valeur relative pour les produits étudiés.

A titre d'exemple, le tableau 1 montre les résultats obtenus dans une expérience où deux produits différents ont été utilisés : d'une part des grains de blé, dans lesquels l'eau présente ne forme pas de glace, même à — 80 °C (à l'a_w choisie), d'autre part un produit carné (lard fumé), dont une partie de l'eau est congelable. Deux échantillons de chaque produit ont été soumis successivement à deux essais comportant chacun les deux variantes en ordre alterné. On observe que les différences entre les valeurs expérimentales ne sont pas significatives.

TABLEAU 1

Valeurs de l'a_w obtenue par la mise en œuvre successive des variantes 1 et 2 (ou 2 et 1) sur les mêmes échantillons

	Échantillon 1		Échantillon 2	
	1re mesure (variante 1)	2e mesure (variante 2)	1re mesure (variante 2)	2e mesure (variante 1)
Blé	0,575	0,572	0,576	0,578
Lard fumé	0,877	0,870	0,874	0,880

Le mode opératoire avec congélation présente, en principe, plus de sécurité, car il évite toute variation de la teneur en eau; on limitera donc l'utilisation de la variante n° 2 aux produits dont la teneur en eau est élevée, et dont la structure risque d'être altérée par la congélation. En pratique, et chaque fois que cela est possible, il est vivement conseillé d'utiliser les deux variantes et d'en comparer les résultats, notamment si l'on souhaite utiliser la variante n° 2 comme méthode de routine sur un produit donné.

4. *Présence d'un espace mort*

L'appréciation du volume mort de l'appareillage de mesure (environ 10 cc) préconisée par LAINE et GAC (1951) dans le cas des mesures hygrométriques, est ici inutile; en effet la détente de la pression de vapeur d'eau, provoquée par la connection de la fiole porte-échantillon au manomètre, est compensée par le produit lui-même, agissant comme régulateur; la quantité de vapeur d'eau ainsi libérée par le produit est absolument négligeable vis-à-vis de la quantité d'eau contenue dans l'échantillon.

5. *Vérification de l'absence de fuite*

L'absence de fuite et une parfaite tenue au vide du dispositif manométrique sont indispensables. Le montage est réalisé avec des robinets dont les boisseaux sont rodés après la soudure des tubulures, et avec des raccords sphériques à joint torique en Viton.

On vérifie facilement l'absence de fuite d'une part à la mise sous vide, à l'aide d'un dispositif à hyperfréquence (Fluvita) qui produit un arc électrique au droit d'une éventuelle fuite, d'autre part, par l'observation de la stabilité, durant plusieurs heures, de la pression de vapeur indiquée par le manomètre.

Un vide de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} Torr (pompe à palette) s'est avéré largement suffisant; l'utilisation d'une pompe à diffusion d'huile (10^{-6} Torr), n'ayant pas amélioré les résultats est donc superflue.

B. — *Répétabilité de la mesure*

1. *Calcul d'erreur théorique*

Le calcul d'erreur permet d'apprécier, d'un point de vue théorique, l'influence des incertitudes des mesures effectuées sur les paramètres pression et température.

Conduit selon la méthode des différentielles logarithmiques sur l'expression (4), il aboutit à la formulation suivante de l'erreur relative :

$$\frac{\Delta a_w}{a_w} \leqslant \frac{\Delta p_t + \Delta p_r}{p_t - p_r} + \frac{\Delta p'}{p'} \tag{5}$$

En remplaçant a_w par sa valeur, l'expression de l'erreur absolue est alors :

$$\Delta a_w \leqslant \frac{\Delta p_t + \Delta p_r}{p'} + a_w \frac{\Delta p'}{p'} \tag{6}$$

Les incertitudes de lecture sur les pressions sont évaluées à $\pm$ 0,5 mm d'huile, soit : $\Delta p_t = \Delta p_r = 0{,}5 . 0{,}0652$ Torr à 20 °C.

La valeur de p' est calculée à $\pm$ 0,01 Torr près, entre 0 et 30 °C, grâce à la relation (DUPRAT, 1975) : $p' = 4{,}580 + 0{,}3334\, t + 0{,}01080\, t^2 + 0{,}000181\, t^3 + 0{,}0000032\, t^4$ (7) où t est la température de l'échantillon, en °C, supposé en équilibre thermique avec l'air. L'erreur relative sur la pression de vapeur saturante dépend donc de la précision de la lecture de température, estimée à $\pm$ 0,1 °C; entre — 20 et + 50 °C, elle est représentée approximativement par la relation établie graphiquement :

$$\frac{\Delta p'}{p'} = (7{,}5 \times 10^{-3} - 5{,}5 \times 10^{-5}\, t) \tag{8}$$

En remplaçant dans (4) Δp_t, Δpr et $\Delta p'$ par leurs valeurs estimées, il vient :

$$\Delta a_w = \frac{0{,}0652}{p'} + a_w(7{,}5 \times 10^{-3} - 5{,}5 \times 10^{-5}\, t) \tag{9}$$

Ainsi, d'un point de vue théorique à 20 °C, l'incertitude absolue varie linéairement de $\pm$ 0,004($a_w = 0$) à $\pm$ 0,01 (pour $a_w = 1$).

2. *Essais de répétabilité*

Nous avons cherché à apprécier expérimentalement la répétabilité (au sens défini par l'AFNOR, norme NF-X-06.041) : « fidélité dans le cas d'un seul opérateur travaillant dans un laboratoire donné, et obtenant des résultats successifs avec le même appareil et la même méthode sur un produit identique soumis à l'essai ».

Dans ce but nous avons donc effectué un nombre important de répétitions sur des échantillons de solution saturée de chlorure de sodium, de solutions de glycérol, et de blé en utilisant dans ce dernier cas les deux variantes du mode opératoire. Le tableau 2 montre les résultats obtenus.

TABLEAU 2

Essais de répétabilité effectués à 20 °C

Produit	NaCl solution saturée	Solution de glycérol à 0,5 g H_2O /g solution	Blé	
			variante 2	variante 1
Nombre de mesures . . .	31	10	26	15
a_w moyenne	0,755	0,813	0,576	0,578
Écart type : s	0,0022	0,0031	0,0039	0,0050
Coefficient de variation (%)	0,29	0,38	0,68	0,86
Intervalle de confiance sur mesure isolée à 5 % près	± 0,004	± 0,006	± 0,008	± 0,01
95 % des mesures comprises entre les valeurs. . . .	0,760 0,751	0,819 0,807	0,584 0,568	0,588 0,568

On note que la répétabilité de la méthode est satisfaisante, avec des coefficients de variation inférieurs à 1 p. 100 (analogues à ceux observés dans le cas du dosage de l'eau sur les céréales par la méthode de référence pratique, MARTIN, 1976).

Dans le cas des substances liquides, la répétabilité apparaît toutefois meilleure que dans le cas des produits solides.

On a vérifié que les populations de mesure sont gaussiennes.

Dans le cas du blé, les différences entre les moyennes et les écarts-types des résultats obtenus avec chacune des deux variantes ne sont pas statistiquement significatives à 5 p. 100 près (test de comparaisons effectué selon SCHWARTZ, 1963).

Selon le théorème limite de LIAPOUNOFF-LINDENBERG (DAGNELIE, 1969) la différence D entre deux variables aléatoires indépendantes distribuées normalement est elle-même distribuée normalement, et la variance de la différence D, est égale à la somme des variances de deux variables. L'intervalle de confiance correspondant représente, au niveau de risque choisi, l'écart maximal qui sera toléré entre deux mesures effectuées sur le même échantillon; lorsque cet écart sera dépassé, il conviendra d'écarter les mesures, l'écart observé étant supérieur à celui qui résulte normalement des fluctuations aléatoires. Le tableau 3 donne les valeurs de cet écart pour les essais effectués.

Ce qui signifie qu'en fixant les écarts maximaux aux valeurs indiquées dans le tableau 3, 5 p. 100 des mesures exactes seront refusées.

TABLEAU 3

Écarts maxima tolérables D, entre deux valeurs isolées de mesure de l'a_w

	Écart-type s	Variance s^2	Variance de D $S^2 = 2\,s^2$	Intervalle de confiance à 5 % (écart maximal tolérable) (*)
NaCl, solution saturée . . .	0,0022	$48{,}10^{-7}$	$96{,}10^{-7}$	± 0,0060
Solution de glycérol 50 % .	0,0031	$96{,}10^{-7}$	$192{,}10^{-7}$	± 0,0085
Blé	0,0050	$25{,}10^{-6}$	$50{,}10^{-6}$	± 0,014

(*) Soit $\pm$ 1,96 $\times$ $2s^2$.

C. — *Justesse de la méthode*

La justesse de la méthode est très difficile à apprécier du fait que d'une part il n'y a pas de substance étalon (du moins qui soit représentative des produits alimentaires) et que d'autre part il n'y a pas actuellement d'autre méthode de référence permettant d'établir la justesse par convergence de deux méthodes absolues indépendantes.

Nous avons pu toutefois vérifier la justesse de la méthode et de l'appareillage utilisé grâce aux comparaisons suivantes.

1. La mesure de la pression de vapeur de l'eau pure en fonction de la température a donné, sur toute la gamme mesurable (65 Torr maximum) des écarts inférieurs à 0,3 p. 100 en valeur relative.

2. La valeur moyenne obtenue comme a_w de la solution saturée de chlorure de sodium à 20 °C après $n = 31$ mesures $\left(a_w \pm \frac{2s}{\sqrt{n}} = 0{,}7554 \pm 0{,}0008\right)$ est très voisine de celle donnée par Ackeson (1965) : $a_w = 0{,}7542 \pm 0{,}0005$.

3. La courbe de l'a_w des solutions de glycérol en fonction de leur concentration établie par notre méthode (fig. 2), montre des écarts aléatoires inférieurs à 0,01, sur tout le domaine d'a_w, avec les données trouvées dans la littérature technique.

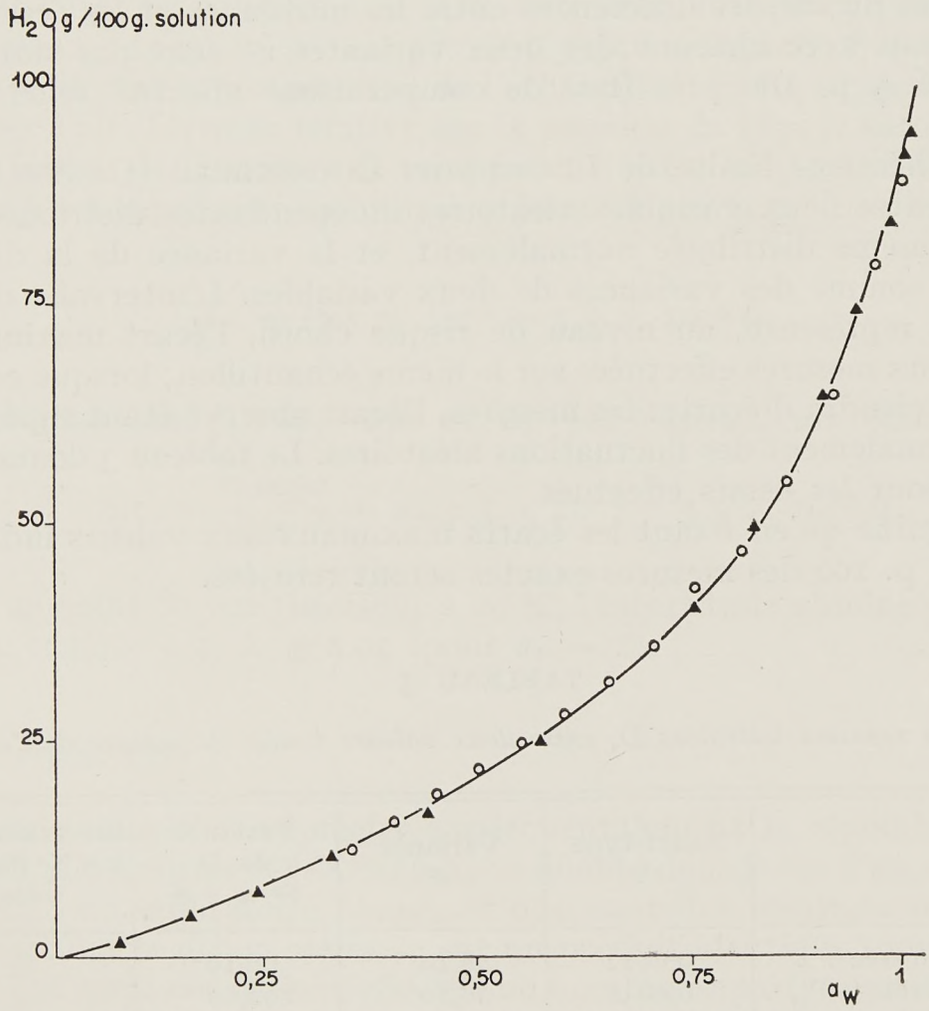


Fig. 2. — *Relation* a_w — *teneur en eau pour le mélange binaire eau-glycérol.*

▲ Méthode manométrique.
○ Données de la littérature (document technique Karl Weiss).

En l'absence de moyens de vérification plus précis, ces quelques résultats permettent de penser que le dispositif manométrique utilisé est juste dans les limites de précision et de répétabilité de la méthode.

Conclusion

La méthode manométrique mise au point, en adaptant la méthode de LAINE, pour la mesure de l'a_w des produits, liquides ou solides, donne donc satisfaction, tant sur le plan justesse que sur celui de la répétabilité.

Compte tenu de sa précision, et de la mesure absolue de pression de vapeur qu'elle réalise, la méthode décrite peut être considérée comme une méthode de référence fondamentale pour la mesure de l'a_w des produits alimentaires.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Remerciements

Ce travail a été effectué grâce à la subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat 75-7-0407) du Comité « Technologie Agricole »).

Summary

A reference method for the determination of water activity in food

Water activity (a_w) is defined and its role and importance in the stability of foods during storage is underlined.

A method for the determination of a_w in foods based on vapour pressure measurement has been studied in order to evaluate its utility as a reference method for other practical methods commonly used.

In this method an oil manometer is used to measure the water vapour pressure in equilibrium with the product at a known and constant temperature. The apparatus, the measuring protocol and the discussion are detailed.

Based on calculation of the precision of the measurement of temperature and pressure and on repeatability assays the accuracy is assumed to be $\pm$ 0,01 a_w at 20 °C. Results obtained with solid products are slightly more scattered then those with liquids.

Références bibliographiques

ACHESON D., 1965. Vapor pressures of saturated aqueous salt solutions. In: WEXLER A. — Humidity and moisture. Measurement and control in science and industry. *Fundamentals and standards*, vol. 3, New York, Reinhold Publishing Corporation, 521-530.

AFNOR, 1972. *Enceintes et conditions d'essais, mesure de l'humidité relative*. Norme NF-X-15-010.

BIZOT H., 1976. *Contribution à la mise au point de deux méthodes de référence pour la mesure de l'activité de l'eau dans les produits alimentaires*. Rapport de DEA de Sciences et Technique des Industries Alimentaires. ENSIA, Septembre.

BIZOT H., TOME D., DRAPRON R., GUILBOT A., MULTON J. L., 1978. *Les aliments à humidité intermédiaire*. Série Synthèse bibliographique, CDIUPA et APRIA, 35, rue du Général-Foy Paris.

CORRY J., 1973. The water relations and heat resistance of micro-organisms. *Progress in industrial microbiology*, **12**, 73-108.

DAGNELIE P., 1969. *Théorie et méthodes statistiques*. Duculot, éditeur.

DRAPRON R., 1972. Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. *Annales de Technologie Agricole*, **21**, n° 4, 487-499.

DUCKWORTH R., 1975. *Water relations of foods*. London, Academic Press.

DUPRAT F., 1975. *Communication personnelle*.

GAL S., 1972. Uber die Ausdrucksweisen der Konzentration des Wasserdampfes bei Wasserdampfsorptionsmessungen. *Helvetica Chimica Acta*, **55**, n° 5, 1752-1757.

KAREL M., 1975. *Free radicals in low moisture systems*. In: DUCKWORTH R. — Water relation of foods. London, Academic Press, 435-453.

LABUZA T., ACOTT K., TATINI S., LEE R., FLINK J., Mc CALL W., 1976. Water activity determination: a collaborative study of different methods. *Journal of Food Science*, **41**, n° 4, 910-917.

LAINE P., GAC A., 1951. *Proceedings of the 8th International Congress on Refrigeration*, 292.

LEISTNER L., RODEL W., 1976. *The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms*. In: DAVIES R., BIRCH G., PARKER K. — Intermediate moisture foods. London, Applied Science Publishers Ltd., 120-137.

LEWIS G. M., RANDALL M., 1923. *Thermodynamics*, New York.

LONCIN M., BIMBENET J., LENGES J., 1968. Influence of the activity of water on the spoilage of foodstuffs. *Journal of Food Technology*, **3**, n° 2, 131-142.

LONCIN M., JACQMAIN D., TUTUNDJIAN-PROVOST A., LENGES J., BIMBENET J., 1965. *Influence de l'eau sur les réactions de Maillard*. Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris, 260, 3208-3211.

LONCIN M., 1976. *Génie Industriel Alimentaire*. Aspects fondamentaux. Paris, Masson éditeur.

MALLETT D., KOHNEN J., SURLES T., 1974. A research note. Determination of water activity in intermediate moisture pet foods by solvent extraction. *Journal of Food Science*, **39**, n° 4, 847-848.

MARTIN G., 1976. *Contribution à la mise au point d'un ensemble cohérent de méthodes de dosage de l'eau dans le Maïs*. Thèse de docteur de l'Université de Paris VI.

MULTON J. L., 1977. *The state of water in biological and natural products*. 7e cours internationaux de Lyophilisation. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

MULTON J. L., GUILBOT A., 1975. *Water activity in relation to the thermal inactivation of enzymic proteins*. In: DUCKWORTH R. — Water relations of Foods. London, Academic Press, 379-396.

O.M.M. (*Organisation Métrologie Mondiale*), 1966, Document n° 188, T.P. 94.

ROBINSON R. A., STOKES R. H., 1959. *Electrolyte solutions*, Butterworths, London.

SMITH P., 1971. The determination of equilibrium relative humidity or water activity in foods. A litterature review. Leatherhead, BFMIRA, *Scientific and Technical Surveys*, n° 70, 29 p.

SCHWARTZ D., 1963. *Méthodes statistiques à l'usage des Médecins et des Biologistes*. Ed. Flammarion.

TAYLOR A., 1961. Determination of moisture equilibria in dehydrated foods. *Food Technology*, **15**, n° 12, 536-540.

TOLEDO R., 1973. *Determination of water activity in foods*. In: Meat Industry Research Conference. Proceedings. University of Chicago, March, 22-23, American Meat Institute Foundation, 85-106.

WEXLER A., RUSKIN R., 1965. *Humidity and moisture. Measurement and control in sciences and industry*. Vol. 1. — *Principles and methods of measuring humidity in gases*. New York, Reinhold Publishing Corporation.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 455-467.

Méthode simplifiée d'analyse des dérivés silyles d'oximes de sucre par chromatographie en phase gazeuse Application aux denrées alimentaires

M. DEMAIMAY

avec la collaboration technique de Marie-Josette LEBOUTEILLER

Laboratoire de Chimie-Biochimie alimentaire,
E.N.I.T.I.A.A., 44072 Nantes Cedex

Résumé

Une méthode simplifiée de l'analyse des dérivés silylés d'oximes de sucres par chromatographie en phase gazeuse a été mise au point. Elle se caractérise essentiellement par sa rapidité, sa sélectivité et sa bonne reproductibilité quantitative.

En effet, l'étude cinétique de la formation des oximes indique que pour la plupart des sucres, 15 min de réaction à 80 °C suffisent. Les mêmes conditions de temps et de température peuvent être retenues pour la réaction de silylation de ces oximes.

L'analyse de ces dérivés volatils sur colonnes capillaires du type OV-101 montre bien qu'ils se dédoublent tous en isomères «syn» et «anti». Toutefois l'utilisation d'une colonne OV-17 à 5 p. 100 permet exception faite du galactose et du ribose de n'obtenir qu'un seul pic chromatographique pour tous les autres sucres étudiés.

Enfin quelques exemples d'application de la méthode sont décrits : analyse de moût de raisin, jus de pomme, confiture, miel, chocolat. L'analyse quantitative menée en comparaison avec la méthode de Bertrand sur des dosages de lactose dans le lait donne une précision relative de 1 p. 100.

Mots clés : *sucres, oximes, dérivés silylés, analyse.*

I. — Introduction

Afin d'identifier et de mieux contrôler la présence des sucres dans les produits naturels et manufacturés du domaine agro-alimentaire, il apparaît nécessaire d'utiliser des méthodes simples, rapides et qui permettent de doser qualitativement et quantitativement un grand nombre de sucres lors d'une seule analyse.

La chromatographie en phase gazeuse est bien adaptée à ce problème. Toutefois, l'analyse directe des sucres n'est pas possible, il faut donc passer par l'intermédiaire des dérivés volatils. Il en existe plusieurs types :

— GEE et WALKER (1962) et WHYTE (1973) s'attachent à décrire l'analyse en chromatographie gazeuse des dérivés o-méthylés et VANDENHEUVEL et HORNING (1961) celle des dérivés o-acétylés;

— dans le cadre de l'étude des aldoses partiellement méthylés ou éthylés, LONGREEN (1971), SWEET (1975) et DARVILL et ROBERTS (1975) développent les méthodes de préparation des alditols acétates;

— UENO (1970) utilise les dérivés o-trifluoroacétylés.

L'ensemble de ces méthodes présente le désavantage d'être relativement longues. De plus, chaque dérivé donne en général plusieurs pics chromatographiques.

— SZAFRANEC, PFAFFENBERGER et HORNING (1973) préconisent la préparation des dérivés acétals après blocage par nitrilation de la fonction aldéhydique. Mais seuls les monosaccharides du type aldose conviennent à cette technique.

— Plusieurs auteurs, SWEELEY *et al.* (1963), DEVILLERS, CORNET, DETAVERNIER (1974), ZURCHER et HADORN (1974, 1975) proposent des méthodes utilisant des dérivés silylés. Celles-ci présentent deux désavantages, car, d'une part, ici encore elles sont longues et d'autre part, la silylation conduit pour chaque sucre à la formation de deux isomères α et β. Ces isomères apparaissent sur les chromatogrammes et il s'en suit dans le cas des mélanges complexes un chevauchement des pics chromatographiques.

— Enfin une méthode plus récente développée par PETERSON (1973) et surtout ZURCHER et HADORN (1975, 1976) utilise les dérivés d'oximes de sucres, et permet d'obtenir un seul pic chromatographique par sucre analysé. Le temps de préparation des dérivés est long et la technique compliquée par des opérations de centrifugation, de réfrigération et de micro-évaporation sous vide.

Nous inspirant de cette dernière méthode, nous développons ici une technique d'analyse qui a l'avantage d'être plus simple et plus rapide, spécifique et bien reproductible du point de vue qualitatif et quantitatif.

L'application qualitative en est faite sur différents produits alimentaires : moût de raisin, jus de pomme, confiture, miel et chocolat. Quant au dosage quantitatif il est illustré par une étude du dosage du lactose dans le lait.

II. — Matériels et méthodes

A. — *Appareillage*

Le chromatographe est un appareil PACKARD, MODEL 419, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. L'intensité du courant à la sortie du détecteur est de $2{,}5 . 10^{-10}$ A. L'injection des échantillons se fait directement en tête de colonne à l'aide d'une seringue S.G.E. de 1 et 5 µl.

Une étude comparative a été effectuée sur trois colonnes chromatographiques différentes :

— une colonne polaire OV-17 dont le taux d'imprégnation est de 5 p. 100 sur « Supelcoport 100-120 mesh »,

— une colonne apolaire SE-30 à 5 p. 100 sur « Supelcoport 100-120 mesh ».

Ces deux colonnes spiralées en verre Pyrex ont 3 m de long et 3 mm de diamètre interne.

— Une colonne capillaire en verre du type OV-101 qui a 25 m de long et 0,35 ± 0,05 mm de diamètre interne.

La température de l'injecteur et du détecteur de l'appareil est de 250 °C. Les débits des gaz :

hydrogène : 30 ml/min,
air : 300 ml/min,
gaz vecteur : azote 30 ml/min avec les colonnes normales OV-17 et SE-30,
azote 2 ml/min avec la colonne capillaire OV-101.

Les quantités de produit injectées sur les colonnes du type OV-17 ou SE-30 varient de 1 à 5 µg par sucre analysé et la limite de saturation est voisine de 10 µg. Avec la colonne capillaire, on injecte en routine 10-20 ng par sucre et la saturation est atteinte vers 40 ng. La durée de vie de ces trois colonnes est d'au moins six mois.

L'intégrateur électronique est un appareil Hewlett Packard, Série 3380 A.

B. — *Produits*

— B.S.T.F.A. N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide contenant 1 p. 100 de T.M.C.S. (triméthyl-chlorosilane) (Supelco).

— Chlorhydrate d'hydroxylamine (Merck).

— Pyridine anhydre (Merck).

— Ribose, arabinose, xylose, fucose, rhamnose, mannose, glucose, fructose, galactose, lactose, lactulose, saccharose, maltose, raffinose (Merck).

— Acétate de zinc (Merck).

— Ferrocyanure de potassium (Merck).

— Méso-inositol (Prolabo).

C. — *Préparation des échantillons d'aliments*

— Jus de pomme, moût de raisin, lait :

A 10 ml du produit, ajouter 0,6 g de méso-inositol, 1 ml de ferrocyanure de potassium puis 1 ml d'acétate de zinc.

Le méso-inositol, utilisé comme étalon interne, présente l'avantage de conduire à un pic chromatographique qui n'interfère pas avec les autres molécules étudiées.

Compléter avec de l'eau distillée à 50 ml.

Agiter, laisser au repos pendant 10 min puis filtrer.

Prélever 50 µl et évaporer à sec sous courant d'azote à l'aide d'un bloc chauffant : 10 à 15 min à 80 °C.

— *Confiture :* Peser 25 g de produit, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, agiter et filtrer.
Prélever 5 µl et évaporer à sec, dans les mêmes conditions que précédemment.

— *Chocolat :* Épuiser 5 g de chocolat par de l'eau distillée tiède jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution. Prélever 10 ml de cette solution dans un tube à centri-

fuger, ajouter de l'acétate neutre de plomb à 5 p. 100 jusqu'à ce qu'il n'y ait plus précipitation : environ 2 ml. Centrifuger 15 min à 15 000 g.
Prélever 20 µl et évaporer à sec dans les mêmes conditions que précédemment.

— *Miel :* Aucune préparation préliminaire n'est nécessaire pour ce produit.
Les dérivés volatils sont préparés directement à partir de ces échantillons.

D. — *Préparation des dérivés silylés d'oximes de sucres*

1° *Préparation des oximes.*

Dans un tube de verre de 1 ml à extrémité conique et de dimensions : 40 mm de long et 10 mm de diamètre interne, introduire :
— 1 mg de sucre à analyser,
— 2 mg environ de chlorhydrate d'hydroxylamine,
— 50 µl de pyridine.
Fermer hermétiquement le tube avec un bouchon garni d'une pastille en téflon et le porter à 80 °C.
Remarque : ce dispositif de fermeture permet après la préparation du dérivé volatil de prélever directement l'échantillon à travers la pastille en téflon, à l'aide de la seringue d'injection.
La cinétique et les temps de formation des oximes sont discutés au chapitre III.

2° *Silylation des oximes.*

Après refroidissement des échantillons d'oximes, introduire 100 µl de B.S.-T.F.A. à 1 p. 100 de T.M.C.S. Porter à 80 °C pendant 15 min puis laisser refroidir jusqu'à la température du laboratoire. L'échantillon peut alors être injecté dans la colonne.

III. — Résultats et discussion

Afin de mieux définir le temps de formation des oximes de sucres, nous avons fait l'étude de la réaction en fonction de la durée du chauffage.
Les chromatogrammes, figures 1*a*, 1*b*, 1*c*, 1*d*, illustrent ces expériences dans le cas du lactose et permettent de déterminer un temps optimum de réaction de 60 min.
En effet, à partir de ce temps (fig. 1*c*), on n'observe plus qu'un seul pic chromatographique qui n'évolue plus dans le temps. Le pic mineur élué avant le lactose et dont on suit la disparition correspond à une fraction du lactose sous forme de dérivé silylé qui n'a pas réagi avec le chlorhydrate d'hydroxylamine.
Des études cinétiques effectuées sur d'autres sucres conduisent aux résultats suivants :
— arabinose, fucose, rhamnose, fructose, galactose, mannose, maltose : 15 min,
— glucose : 30 min,
— xylose, ribose : 45 min,
— lactose, lactulose : 60 min.

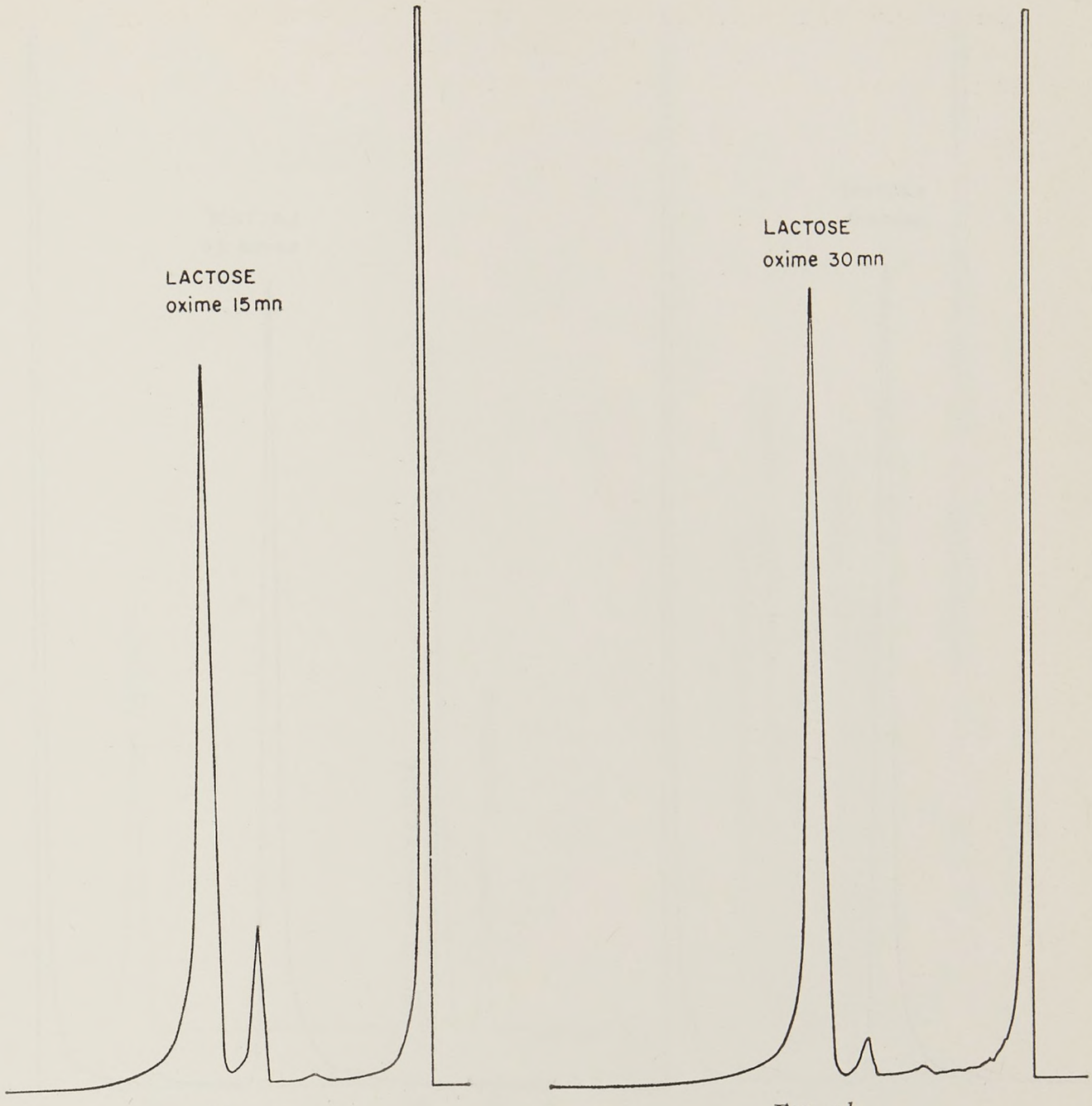


FIG. 1*a*. FIG. 1*b*.

FIG. 1. — *Les figures 1a, 1b, 1c, 1d, montrent l'évolution des pics chromatographiques des dérivés silylés, en fonction du temps de formation de l'oxime de lactose.*

Conditions d'analyse : — colonne OV-17 à 5 p. 100,
— température du four : 230 °C en isotherme.

Dans la méthode proposée par ZURCHER, HADORN et STRACK (1975), le temps de formation des oximes de sucres est constant et égal à une heure. Les résultats obtenus ici montrent bien que ce temps varie en fonction de la nature des sucres et qu'il est le plus souvent inférieur à une heure puisqu'on remarque que pour au moins 7 d'entre d'eux la réaction est terminée après seulement 15 min.

De même le temps de silylation de ces oximes peut être ramené à 15 min dans tous les cas.

L'analyse de ces dérivés volatils conduit à l'obtention d'un unique pic chromatographique par sucre (fig. 2). On note toutefois certaines exceptions pour le ribose et le galactose (fig. 3) avec lesquels on observe un double pic.

L'utilisation d'une colonne apolaire du type SE-30 à 5 p. 100 nous a permis

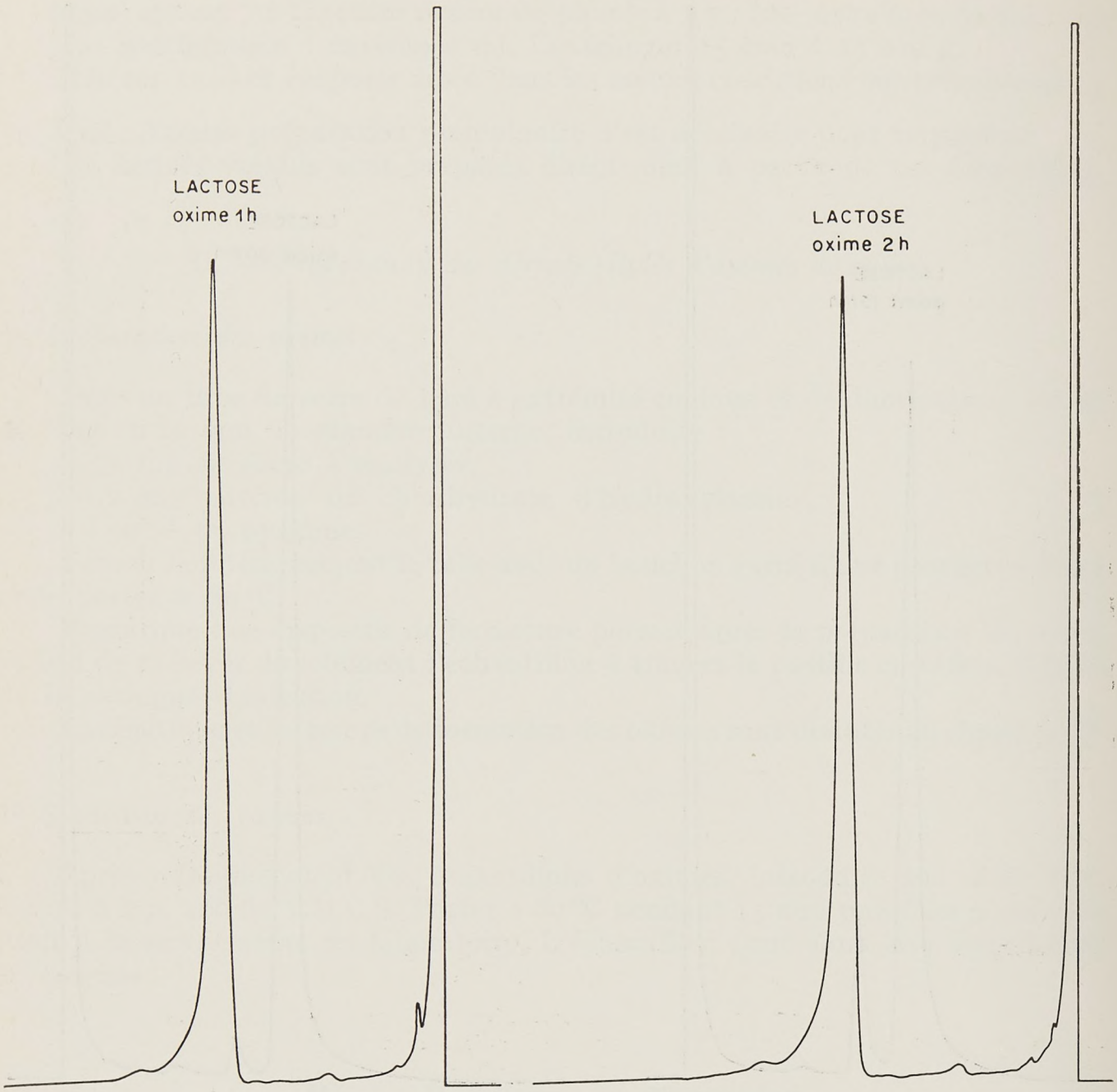


FIG 1*c*. FIG. 1*d*.

de vérifier comme l'indiquaient MASON et SLOVER (1971) la présence d'un double pic pour certains sucres et en particulier pour le galactose et le glucose (fig. 4). On remarque toutefois que le fructose ne donne ici, de même que sur colonne OV-17, qu'un seul pic.

C'est à l'aide d'une colonne capillaire OV-101 que nous avons réussi à séparer parfaitement deux pics chromatographiques pour chaque dérivé silylé d'oximes de sucres. Sur la figure 5, on distingue nettement les deux pics de fructose, ce qui n'était pas le cas avec les colonnes normales du type SE-30 ou OV-17.

Cette étude nous permet donc d'affirmer la présence des deux isomères « syn » et « anti » des oximes de sucres. Le schéma de formation de ces isomères est représenté figure 6. L'hypothèse que les groupements volumineux se repoussent plus que les petits, permet ordinairement de prévoir correctement la stabilité relative des isomères géométriques. De ce fait, il est raisonnable de penser que l'isomère « syn » est caractérisé sur la figure 6 par le pic chromatographique le plus grand.

Il apparaît donc que les caractéristiques de la phase polaire OV-17 ne per-

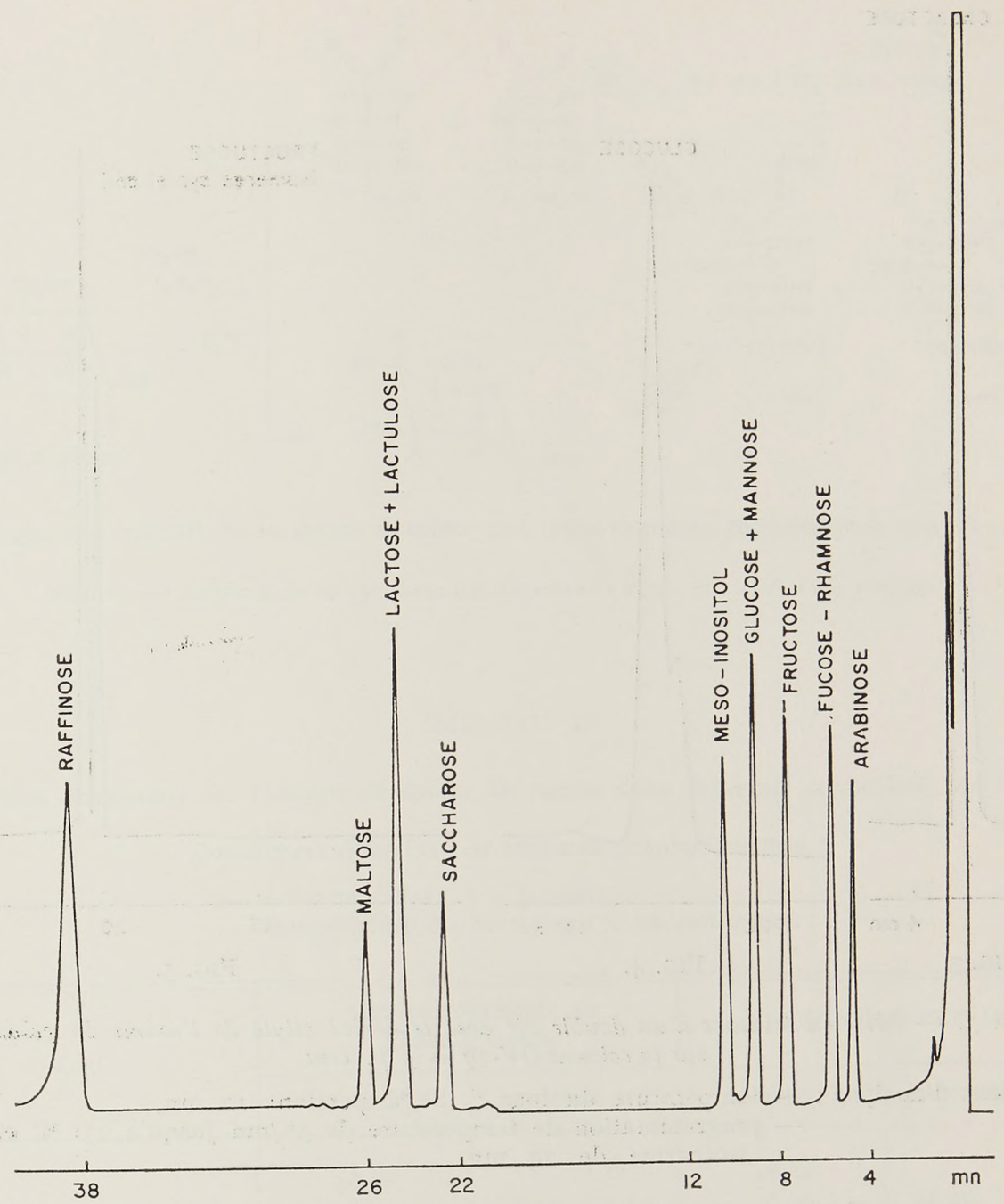


FIG. 2. — *Dérivés silylés des oximes d'arabinose, fucose, rhamnose, fructose, glucose, mannose, lactose, lactulose, maltose et dérivés silylés du méso-inositol, du saccharose et du raffinose.*

Conditions d'analyse : — colonne OV-17 à 5 p. cent,
— température du four : 150 °C,
— programmation de température de 4° /mn jusqu'à 270 °C et palier isotherme de 10 mn.
— injecteur-détecteur : 275 °C.

mettent pas la séparation des isomères « syn » et « anti », exception faite pour le galactose et le ribose.

Cette propriété est intéressante, car l'étude des sucres, dans les milieux alimentaires en particulier, s'en trouve simplifiée. La présence d'un seul pic par sucre conduit à une analyse qualitative et quantitative plus simple et précise, surtout dans les cas de mélange. Néanmoins, certains sucres possèdent des temps de rétention identiques ou très proches, et sont de ce fait confondus en un seul pic chromatographique, exemple : glucose et mannose, fucose et rhamnose.

Il faut souligner ici que contrairement à la méthode préconisée par ZURCHER

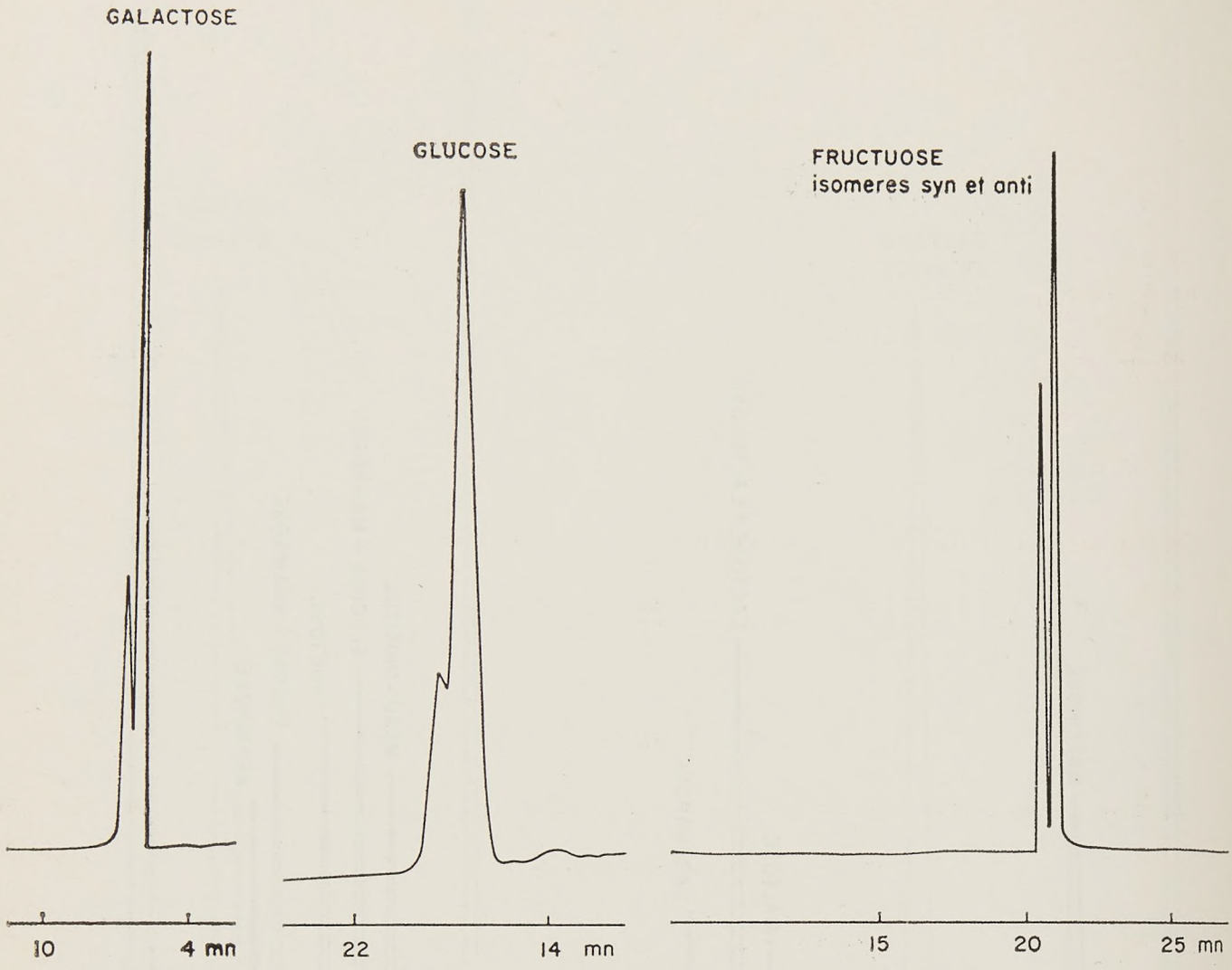


FIG. 3 FIG. 4. FIG. 5.

FIG. 3. — *Mise en évidence d'un double pic avec le dérivé silylé de l'oxime de galactose sur la colonne OV-17 à 5 p. cent*

Conditions d'analyse : — température du four : 180 °C pendant 10 mn,
— programmation de température de 5° /mn jusqu'à 230 °C et palier isotherme de 20 mn.

FIG. 4. — *Par passage sur colonne apolaire du type SE-30, on remarque la présence d'un double pic avec le glucose.*

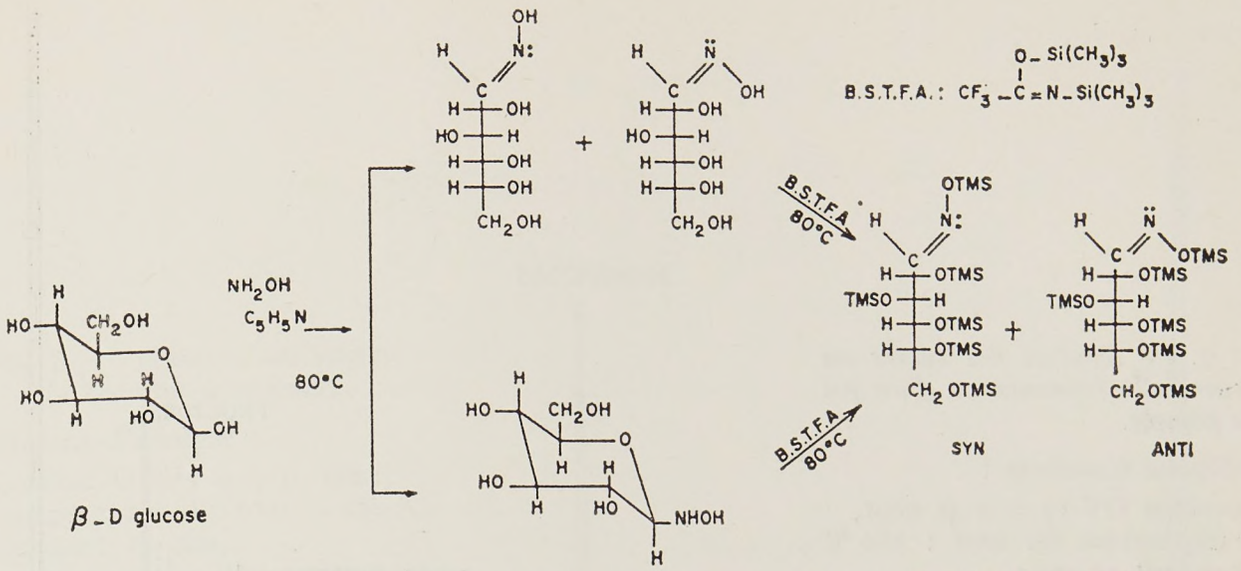
Conditions d'analyse : colonne SE-30 à 5 p. cent,
— température du four, 180 °C en isotherme.

FIG. 5. — *Analyse du fructose sur colonne capillaire OV-101.*

Conditions d'analyse : — quantité injectée : 20 ng sur colonne capillaire de 25 m,
— température initiale du four : 180 °C puis programmation de 1° /mn.

(1975), il n'apparaît pas nécessaire d'effectuer une extraction de l'eau résiduelle des sucres avant l'étape de formation des oximes. Cette extraction qui est faite par l'intermédiaire d'une solution méthanol-eau (1 /1) nécessite un micro-appareillage spécifique d'évaporation sous vide.

Nous avons constaté qu'une simple évaporation à sec sous courant d'azote est suffisante pour l'analyse des sucres dans les échantillons alimentaires. En effet, les chromatogrammes obtenus ne laissent pas apparaître de pics parasites qui auraient comme origine la présence de traces d'eau dans ces échantillons.



L'α-D glucose conduit de la même manière aux deux isomères géométriques syn et anti.

FIG. 6. — *Schéma de la synthèse des isomères « syn » et « anti » du glucose.*

TABLEAU I

Tableau comparatif des résultats de dosage du lactose dans différents échantillons de lait.

Conditions d'analyse en chromatographie gazeuse :

— colonne OV-17 à 5 p. cent,
— température du four : 230 °C en isotherme.

Lait	Chromatographie en phase gazeuse		Méthode de BERTRAND	
	essais g/l	moyenne g/l	essais g/l	moyenne t/l
Échantillon n° 1	48,00 48,05 48,20	48,10 ± 0,10	48,50 48,00 48,00	48,20 ± 0,30
Échantillon n° 2	47,20 47,70 47,00	47,30 ± 0,40	47,85 48,10 48,10	48,00 ± 0,10
Échantillon n° 3	48,00 47,65 48,50	48,10 ± 0,45	48,85 49,10 48,85	48,90 ± 0,20
Échantillon n° 4	47,00 46,50 46,80	46,80 ± 0,30	47,30 47,75 47,75	47,60 ± 0,30
Échantillon n° 5	47,00 47,10 46,90	47,40 ± 0,10	47,80 47,60 48,20	47,90 ± 0,30
Échantillon n° 6	47,55 47,30 47,40	47,10 ± 0,15	47,80 48,30 48,30	48,10 ± 0,30

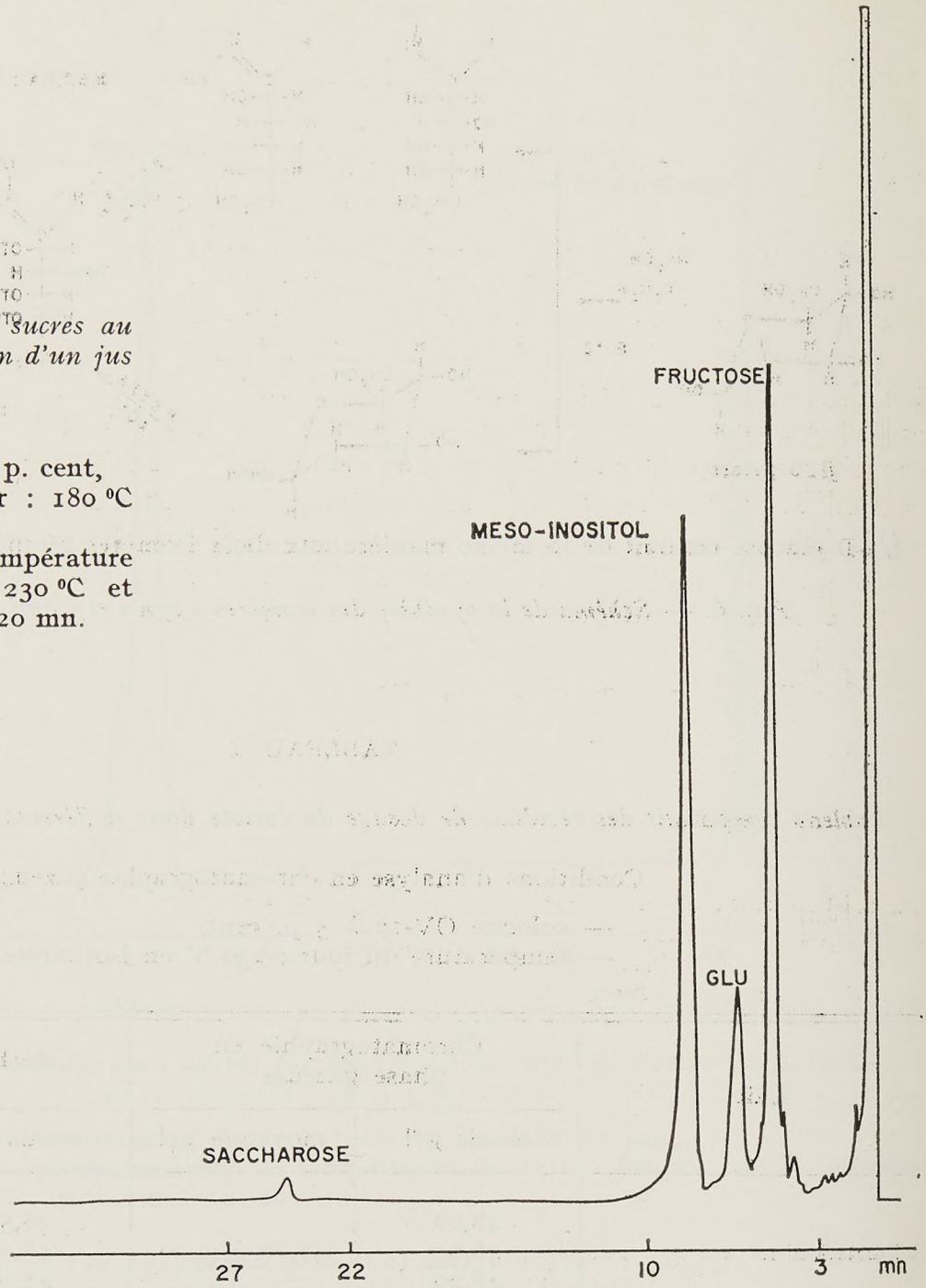


FIG. 7. — *Analyse des sucres au cours de la fermentation d'un jus de pomme.*

Conditions d'analyse :

— colonne OV-17 à 5 p. cent,
— température du four : 180 °C pendant 10 mn,
— programmation de température de 5°/mn jusqu'à 230 °C et palier isotherme de 20 mn.

Applications de la technique d'analyse à différents produits alimentaires

Nous donnons avec les figures 7 et 8 des exemples de la détermination qualitative de différents sucres dans les produits alimentaires liquides et solides. En particulier, il est facile de suivre à l'aide de cette technique l'évolution des sucres pendant la fermentation d'un jus de pomme ou d'un moût de raisin.

Les dosages effectués sur les autres produits alimentaires tels que le miel, la confiture, le chocolat se font sans difficulté. Avec ce dernier, la sensibilité de l'analyse permet de mettre en évidence la présence de trace de glucose et de fructose qui proviennent d'une faible hydrolyse du saccharose (fig. 8).

L'étude quantitative a été menée en prenant comme support le dosage du

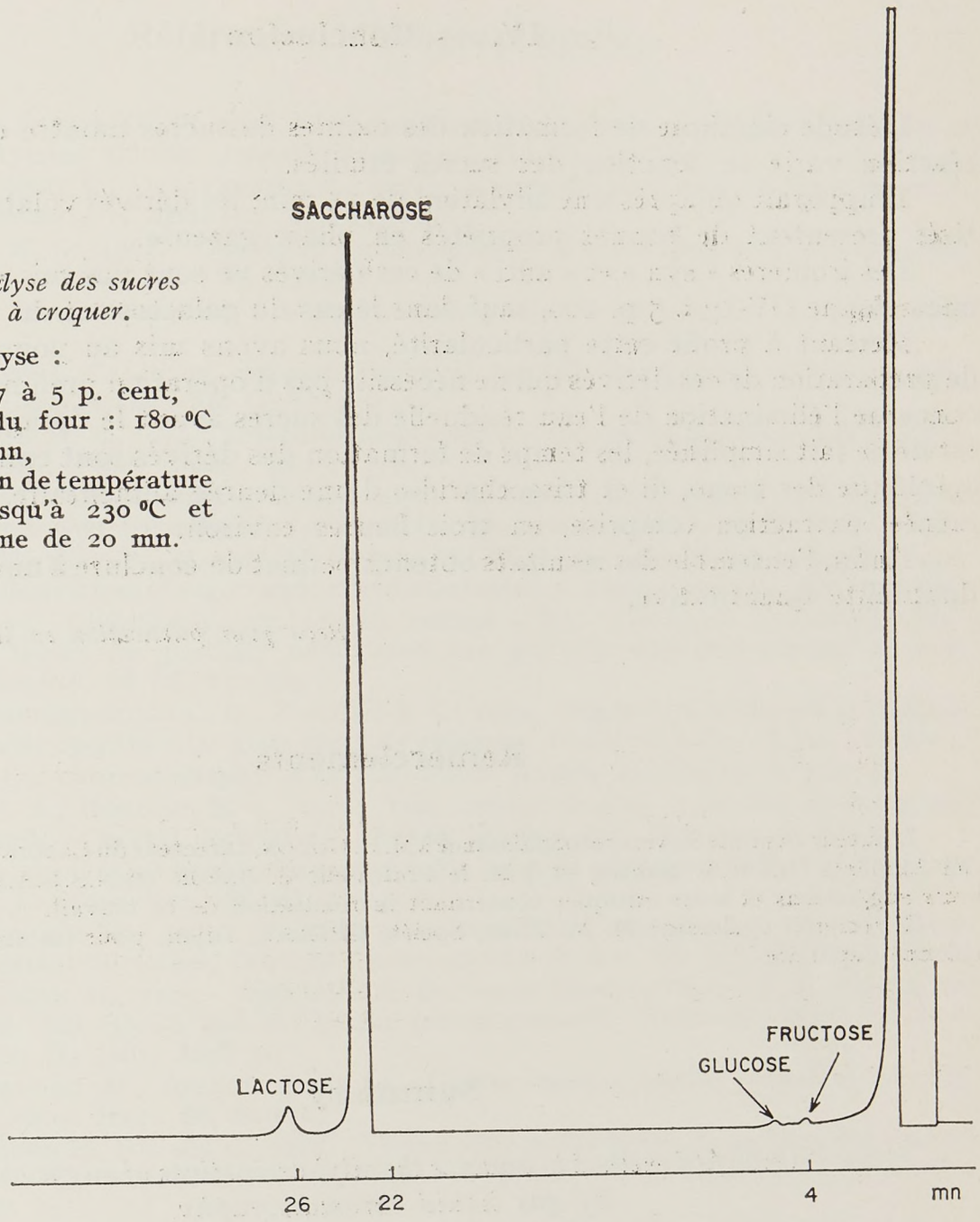


FIG. 8. — *Analyse des sucres du chocolat à croquer.*

Conditions d'analyse :
— colonne OV-17 à 5 p. cent,
— température du four : 180 °C pendant 10 mn,
— programmation de température de 5°/mn jusqu'à 230 °C et palier isotherme de 20 mn.

lactose dans le lait. A cet effet, nous avons comparé les résultats obtenus avec cette méthode et celle de BERTRAND (LECOQ, 1965), qui est la méthode officielle de dosage du lactose.

L'étude porte sur six échantillons différents et les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

La précision du dosage effectué selon la méthode de BERTRAND est fixée à ± 0,5 g/l. On remarque que l'écart moyen maximum observé avec l'analyse en chromatographie gazeuse est de l'ordre de 0,5 g/l. La précision relative de la méthode est satisfaisante et peut donc être fixée à 1 p. 100. On observe toutefois que les valeurs obtenues en chromatographie gazeuse sont sensiblement inférieures à celles de la méthode de BERTRAND. Compte-tenu du faible écart, il est difficile d'en tirer des conclusions précises, cependant on peut émettre l'hypothèse que la méthode de BERTRAND dose globalement tous les composés réducteurs alors que l'analyse en chromatographie gazeuse reste spécifique du lactose.

IV. — Conclusion

L'étude cinétique de formation des oximes de sucres montre que le temps de réaction varie en fonction des sucres étudiés.

Il apparaît qu'après une silylation de 15 min, les dérivés volatils ainsi synthétisés présentent de bonnes propriétés en phase gazeuse.

Les isomères « syn » et « anti » de ces dérivés ne sont pas mis en évidence sur une colonne OV-17 à 5 p. 100, sauf dans le cas du galactose et du ribose.

Mettant à profit cette particularité, nous avons mis au point une méthode de préparation de ces dérivés qui ne nécessite pas d'opération préliminaire en ce qui concerne l'élimination de l'eau résiduelle des sucres avant le dosage. La technique est de ce fait simplifiée, les temps de formation des dérivés sont courts et l'analyse spécifique des mono, di et trisaccharides d'une denrée alimentaire peut ainsi être menée, extraction comprise, en trois heures environ.

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus permet de conclure à une bonne reproductibilité quantitative.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Remerciements

L'auteur exprime sa vive reconnaissance à M. B. Godon, Directeur du Laboratoire de Biochimie des Aliments (I.N.R.A. Nantes) et à M. le Professeur C. Baron (E.N.S.B.A.N.A. Dijon) pour leurs suggestions et leurs critiques concernant la réalisation de ce travail.

Il remercie également M. M. Prost, Société SPIRAL, Dijon, pour les essais effectués sur colonne capillaire.

Summary

Simplified method to analyse the silyl derivatives of sugar oximes by gas liquid chromatography
Application to food analysis

A simplified method to analyse the silyl derivatives of sugar oximes by gas liquid chromatography has been worked out. Its main characteristics are rapidity, selectivity and a good quantitative reproductibility.

The kinetic study of the way oximes are formed indeed shows that for most sugars a 15 mn reaction at 80 °C is enough. The same conditions of time and temperature can be kept for the silylation reaction of these oximes.

The analysis of these volatile derivatives in capillary columns of the OV-101 type shows very well they all divide into « syn » and « anti » isomers. However, the use of a OV-17 column at 5 p. 100 leads — except for galactose and ribose — to a single chromatographic peak for all the other sugars studied.

Finally a few examples of how the method is applied are described: analysis of must, apple juice, jam, honey, chocolate. The quantitative analysis carried out in comparison with Bertrand's method on amounts of lactose in milk gives a relative precision of one per cent (1 p. cent).

Key words : *analysis, sugars, oximes, silyl derivatives.*

Références bibliographiques

DARVILL A. G., ROBERTS D. P., 1975. Improved gas-liquid chromatographic separation of methylated acetylated alditols. *Journal Chromatogr.*, **115** (2), 319-324.

DEVILLERS P., CORNET C., DETAVERNIER R., 1974. Dosage du saccharose et bilan du sucre. *Industries alimentaires et agricoles*, 7-8, 833-839.

GEE M., WALKER H. G., 1962. Gas liquid chromatography of some methylated mono-di- and trisaccharides. *J. Anal. Chem.*, **34**, 650-658.

LECOQ R., 1965. *Manuel d'analyses élémentaires et d'expertises usuelles*, vol. 2, 1224-1227, Doin Paris.

LONNGREEN J., 1971. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. *Acta. Chem. scand.*, **25**, (3) 1144-1145.

MASON B. S., SLOVER H. T., 1971. Gas chromatographic method for the determination of sugars in foods. *J. Agric. Foods Chem.*, **19**, 551-554.

PETERSON G., 1973. Gas-chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives. *Carbohydrates Research*, **33**, 47-61.

SWEELEY C. C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS W. W., 1963. Gas-liquid chromatography of trimethysilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497-2507.

SWEET D. P., 1975. Quantitative analysis by various G.L.C. (Gas-liquid chromatography); response-factor theory for partially methylated and partially ethylated alditols acetates. *Carbohydrate Research*, **40** (2), 217-225.

SZAFRANEC J., PFAFFENBERGER C. D., HORNING E. C., 1973. Separation of aldoses and alditols using thermostable open tubular glass capillary columns. *Analytical Letters*, **6** (6), 479-492.

UENO T., 1970. Gas-chromatography of carbohydrates. *Kagaku to Seibutsu*, **8**, 144-151.

VANDENHEUVEL J. A., HORNING E. C., 1961. Gas chromatographic separation of sugars and related compounds as acetyl derivatives. *Biochem. Biophy. Res. Commun.*, **4**, 399-407.

WHYTE J. N. C., 1973. Gas-liquid chromatographic analysis of permethylated alditols and aldonics acids. *J. Chromatogr.*, **87** (1), 163-168.

ZURCHER K., HADORN H., 1974. Versuche zur Herstellung und gaschromatographischen Trennung der Zucker-Silyläther. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **70**, Jahrg Heft 12.

ZURCHER K., HADORN H., 1975. Optiemierung der versuchsbedingungen zur silylierung der Zucker mit BSA und HMDS und der gaschromatographischen Trennung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **71**, Jahrg Heft 2.

ZURCHER K., HADORN H., STRACK C., 1975. Gaschromatographische Zuckerbestimmung. *Mitt. Gebiete Lebens. Hyg.*, **66**, 92-116.

ZURCHER K., HADORN H., STRACK C., 1975. Vereinfachte methode zur Herstellung der Zucker-oxim-silylderivate für die gaschromatographischen Analyse. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **71**, Jahrg Heft 11.

ZURCHER K., HADORN H., 1976. Vergleichende Zucker-Bestimmungen mit gaschromatographischen, enzymatischen und Reduktometrischen methoden. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **72**, Jahrg Heft 6.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 469-488.

Réacteur enzymatique tubulaire à glucoamylase adsorbée sur une résine anionique Application à l'hydrolyse de maltodextrines

M. BELLAL, J. BOUDRANT et C. CHEFTEL

Laboratoire de Biochimie et Technologie alimentaires,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
35060 Montpellier, France

Résumé

1. Les conditions optimales d'adsorption d'une préparation commerciale de glucoamylase (E.C.3.2.1.3.) (d'*Aspergillus niger*) sur une résine échangeuse d'ions (Amberlite IRA 93) ont été déterminées. Un préséchage de la résine avant mise en contact avec la solution enzymatique est favorable. Le pH optimum d'adsorption est de 5,2. Un temps de contact (à 4 °C) de 5 h est nécessaire pour obtenir une activité enzymatique adsorbée maximum. L'activité enzymatique adsorbée croît avec la concentration de la solution enzymatique mise en œuvre jusqu'à l'obtention d'un maximum. Le rendement global d'activité enzymatique adsorbée (activité adsorbée / activité mise en œuvre initialement) décroît au fur et à mesure que l'on se rapproche de ce maximum.

2. Les propriétés de la glucoamylase adsorbée ont été étudiées. L'enzyme adsorbée maintient une activité élevée vis-à-vis de solutions de maltose et de maltodextrines, et de solutions diluées d'amidon. L'adsorption augmente légèrement la stabilité thermique de l'enzyme; l'incubation de l'enzyme adsorbée en tampon acétate de sodium, pH 4, à 40 °C, pendant 48 h, ne provoque pratiquement pas de désorption ou d'inactivation. Une perte d'activité intervient toutefois lors d'incubation à pH 3. Les pH optimum apparents de l'enzyme adsorbée et de l'enzyme libre sont respectivement de 3 et de 4,6. A pH 4, l'enzyme adsorbée possède environ 50 p. 100 de l'activité à pH 3.

3. Un réacteur tubulaire à glucoamylase adsorbée a été utilisé pour l'hydrolyse en continu de solutions de maltose (12 p. cent *p/v*), de maltodextrines (25 p. cent *p/v*) et d'amidon (1 p. cent *p/v*). Le taux d'hydrolyse des liaisons glucosidiques atteint 70 à 100 p. 100 pour un temps de résidence des solutions dans le réacteur de 100 min.

La stabilité microbiologique du réacteur peut être maintenue pendant une période prolongée en pratiquant une pasteurisation préalable des solutions de substrats.

Dans ces conditions, l'hydrolyse continue d'une solution de maltodextrines (DE 4-5), à 25 p. 100 (*p/v*), dans un tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, a pu être effectuée pendant 30 jours, à 40 °C, et avec un temps de résidence de 50 min. Le taux d'hydrolyse est resté constant et égal à 70 p. 100.

Mots clés : *glucoamylase, enzyme immobilisée, glucose, maltodextrines.*

Introduction

L'emploi d'enzymes pour catalyser des réactions d'intérêt industriel présente certains avantages, en particulier la spécificité d'action dans des conditions modérées de température, de pH et la possibilité de réactions continues. Les principaux désavantages sont liés à l'instabilité et au prix des enzymes.

L'amélioration des techniques de production par fermentation microbienne (DEMAIN, 1971), la mise au point de techniques nouvelles de purification (CUATRECASAS et ANFINSEN, 1971), la possibilité de fixer les enzymes et de les réutiliser (GRYSKIEWICZ, 1971; ZABORSKY, 1973), permettent d'entrevoir une utilisation accrue de ces catalyseurs dans l'industrie (DURAND et BAUDRAS, 1975). Les principales applications relèvent de la technologie alimentaire et de la chimie analytique (REED, 1975; DURAND et MONSAN, 1975; GUILBAUT et KRAMER, 1972; UNDERKOFLER, 1972).

La production croissante d'amylases s'explique par des applications diverses (DELECOURT, 1972; FORGARTY, GRIFFIN et JOYCE, 1974). Selon PYE (1974) et DURAND et BAUDRAS (1975), la production d'amylases aux États-Unis représenterait 31 millions de Francs en 1971 et 50 millions en 1975.

L'une des principales utilisations des amylases dans l'industrie alimentaire a trait à la production de glucose à partir d'amidon (PYE, 1974). L'hydrolyse industrielle de l'amidon est généralement effectuée par l'une des méthodes suivantes : la première consiste à pratiquer successivement une hydrolyse acide et une hydrolyse par la glucoamylase (E.C.3.2.1.3.) (KINGMA, 1966; FORGARTY, GRIFFIN et JOYCE, 1974). La seconde met successivement en œuvre deux types d'enzymes : enzymes « liquéfiantes » (α-amylases (E.C.3.2.1.1.), généralement d'origine bactérienne), puis « saccharifiantes » (β-amylases (E.C.3.2.1.2.) ou glucoamylase selon le produit final désiré, maltose ou glucose (KOMAKI, 1968; FORGARTY, GRIFFIN et JOYCE, 1974; BARFOED, 1976).

La glucoamylase (ou amyloglucosidase) catalyse l'hydrolyse d'amylose et d'amylopectine en D-glucose (PAZUR et KLEPPE, 1962). Le mécanisme d'attaque du substrat semble être du type monochaîne (GREENWOOD et MILNE, 1968). L'hydrolyse touche les liaisons α-D (1 → 4), α-D (1 → 6) et α-D (1 → 3).

La vitesse d'hydrolyse croît avec le degré de ramification et avec la masse molaire du substrat pour des concentrations pondérales constantes d'enzymes et de substrat; ainsi, des vitesses d'hydrolyse sont de 40, 10 et 1, respectivement pour l'amylopectine, l'amylose et le maltose (KING, 1967; KAISER, 1971).

La glucoamylase est le plus souvent isolée de moisissures telles que : *Aspergillus niger* (KEERE, CLEVELAND et ICATZBECK, 1951), *Aspergillus oryzae* (OHGA, SHIMIZU et MOKITA, 1968), *Rhizopus delemar* (PHILLIPS et CALDWELL, 1951), *Corniphora cerebella* (KING, 1967), *Endomyces sp* (FUKUI et NIKUNI, 1969), *Aspergillus awamori* (RYZHAKOVA et FENIKSOVA, 1972).

La glucoamylase d'*Aspergillus niger* est une glycoprotéine de masse molaire 97 000 qui contient environ 13 p. 100 de glucides (PAZUR et OKADA, 1967). Elle est utilisée sous forme soluble dans l'industrie pour la saccharification de l'amidon ou pour la préparation de « sirops de glucose » (SOLOMON et LEVIN, 1975).

La mise au point de techniques d'insolubilisation et de réacteurs continus avec rétention et réutilisation d'amylases a déjà été étudiée. Ces enzymes peuvent être retenues sous forme soluble par une membrane d'ultrafiltration (BUTTERWORTH, WANG, SINSKEY, 1970; O'NEILL *et al.*, 1971; TACHAUER, COBB et SHAH,

1974; BOUDRANT et CHEFTEL, 1973*a*), ou immobilisées sur un support insoluble (ZABORSKY, 1973; SMILEY *et al.*, 1974; WEETALL *et al.*, 1975; SUZUKI, AIZAWA et KARUBE, 1975; GOLDSTEIN et KATCHALSKI, 1976).

Les réacteurs à cellule d'ultrafiltration s'étant révélés peu efficaces (BELLAL, 1975), nous avons utilisé le second principe d'immobilisation.

La glucoamylase fixée permet d'hydrolyser en continu des solutions de maltose, maltodextrines ou d'amidon en réacteur tubulaire à l'échelle du laboratoire ou pilote (WILSON et LILLY, 1969; O'NEILL, DUNNILL et LILLY, 1971; WEETALL, 1971; WEETALL et HAVEWALA, 1972; CORNO, GALLI et MORISI, 1972; DINELLI, MORISI et CORNO, 1972; MAEDA et SUZUKI, 1972; GRUESBECK et RASE, 1972; MARSH, LEE et TSAO, 1973; SOLOMON et LEVIN, 1975; LEE, LEE et TSAO, 1975; LEE *et al.*, 1976; CALDWELL *et al.*, 1976; KUCERA, 1976; BELLAL, BOUDRANT et CHEFTEL, 1976; WEETALL *et al.*, 1974; BRILLOUET, COULET et GAUTHERON, 1976; BRILLOUET, COULET et GAUTHERON, 1977; KAWASHIMA et UMEDA, 1976).

Certains travaux ont porté sur la fixation de la glucoamylase par simple adsorption (BACHLER, STRANDBERG et SMILEY, 1970; PARK et LIMA, 1973; SOLOMON et LEVIN, 1974; PARK, 1974).

Dans le présent travail, nous décrivons l'adsorption de la glucoamylase (d'*Aspergillus niger*) sur une résine échangeuse d'ions (déjà utilisée pour la fixation de l'invertase, BOUDRANT et CHEFTEL, 1973*b*) et la mise au point de réacteurs tubulaires à glucoamylase adsorbée.

La stabilité du réacteur a été étudiée du point de vue de la persistance de l'activité enzymatique et de la prévention du développement de micro-organismes.

Matériel et méthodes

Réactifs

— L'amidon de maïs (n° 48 087) et le maltose pour « usage biochimique » proviennent de Roquette (Lille, France) et Merck (Darmstadt, Allemagne), les maltodextrines (n° 01908, DE 4-5, soluble dans l'eau) de la Société des Produits du Maïs (Clamart, France).

— Les solutions enzymatiques de glucoamylase non purifiée pour « usage industriel » Amigase 50 et Novo 150 L (d'*Aspergillus niger* dans les 2 cas) proviennent respectivement de Rapidase (Seclin, France) et de Novo Industrie (Copenhague, Danemark). L'activité spécifique mesurée sur substrat amidon solubilisé 1 p. 100 (*p*/*v*), tampon acétate de sodium, pH 4 à 25 °C, est égale respectivement à 184 UI/mg de protéines pour la glucoamylase Rapidase et à 143 UI/mg de protéines pour la glucoamylase Novo.

— Le réactif « Glucostat » (glucose-oxydase, peroxydase, orthodianisidine) provient de Worthington Biochemical Coorporation (New-Jersey, U.S.A.); l'acide dinitro 3,5-salicylique (D.N.S.) provient de Merck.

— Le support utilisé est une résine échangeuse d'anions de type Amberlite « macroréticulée » (IRA 93). Elle provient de ROHM et HAAS (Philadelphie, U.S.A.) et consiste en polymère d'un dérivé du styrène réticulé à l'aide du divinyl benzène. Les billes de résine ont un diamètre compris entre 0,4 et 0,5 mm et possèdent des pores de diamètre moyen égal à 1 300 Å; cette structure spongieuse permettrait l'accès de macromolécules aux sites ioniques internes et entraînerait une plus grande capacité d'échange que la résine du type « gel ».

Adsorption de la glucoamylase sur la résine échangeuse d'ions

La méthode de fixation mise en œuvre est déjà utilisée pour l'invertase (BOUDRANT et CHEFTEL, 1975). Elle consiste en une adsorption de l'enzyme sur la résine échangeuse d'ions. La résine est préalablement lavée avec de l'eau distillée, puis équilibrée au pH désiré (généralement pH 4) avec un tampon acétate de sodium 0,01 M. Après filtration, la résine est séchée sous vide. Elle est ensuite mise au contact d'une solution (5 ml) plus ou moins diluée de glucoamylase dans un tampon acétate de sodium 0,01 M de même pH. L'adsorption est réalisée pendant un maximum de 12 h à 4 °C. Après adsorption, la résine est lavée avec la même solution de tampon (20 ml/g de résine sèche), sous agitation pendant 30 min à 25 °C. Ce lavage est renouvelé jusqu'à ce que l'adsorbance (280 nm) de la solution de lavage devienne nulle.

Réacteurs enzymatiques

Les hydrolyses discontinues d'amidon, maltodextrines et maltose ont été réalisées dans un réacteur à double enveloppe de capacité 50 ml.

Les hydrolyses continues d'amidon, maltodextrines et maltose par l'enzyme immobilisée ont été faites dans un réacteur tubulaire constitué, soit par une colonne Pharmacia, type K 9/30 (diamètre 9 mm, hauteur 300 mm), soit par une colonne, type 35/65 (diamètre 35 mm, hauteur 650 mm) contenant la résine. Une double enveloppe et un bain thermostaté permettent de maintenir la température constante. Les solutions à hydrolyser sont introduites en continu à l'aide d'une pompe péristaltique (Biolafitte).

Conditions d'hydrolyse et détermination du taux d'hydrolyse

L'hydrolyse du substrat (amidon, maltodextrines ou maltose) est faite en solution acétate de sodium 0,01 M, pH 4. Les solutions d'amidon sont préparées en chauffant 2 min à 80 °C une suspension d'amidon à 1 p. 100 (*p*/*v*). Les solutions de maltodextrines et de maltose sont respectivement à 25 p. 100 et 12 p. 100 (*p*/*v*). L'hydrolyse est suivie, soit par dosage des groupements réducteurs libérés (réactifs D.N.S.; BERNFELD, 1955), soit par dosage du glucose à l'aide du système glucose-oxydase, peroxydase (réactif « Glucostat »). Le taux d'hydrolyse est la quantité de glucose libéré par rapport à la quantité de glucose qui serait libéré si tout le substrat était hydrolysé.

Pour les études cinétiques (expériences discontinues), l'hydrolyse est arrêtée après une période totale d'incubation de 30 min, soit par addition du réactif D.N.S. (ou d'hydroxyde de sodium 0,1 N), soit par chauffage à 100 °C pendant 2 min (dans le cas du dosage à la glucose-oxydase). Il a été vérifié que l'hydrolyse supplémentaire due à ce chauffage est négligeable par rapport à celle due à l'activité enzymatique.

Pour mesurer l'activité enzymatique, la courbe de début d'hydrolyse est tracée et la valeur de la pente à l'origine est déterminée.

L'unité d'activité enzymatique est exprimée en Unité Internationale. Une

Unité Internationale est la quantité d'enzyme qui catalyse la libération d'une micromole de glucose par minute dans nos conditions expérimentales.

Pour l'enzyme adsorbée, l'activité est exprimée en Unité Internationale par gramme de résine sèche.

Dénombrement de microorganismes

Afin d'étudier la stabilité microbiologique du réacteur, le nombre de microorganismes totaux présents dans les solutions de substrats hydrolysés ou non, a été évalué à l'aide de la méthode de dilutions successives en utilisant les tables statistiques de MAC GRADY (COCHRAN, 1950). Le milieu de dilution est une solution d'extrait delevure 0,5 p. 100 (MERIEUX, n° 53161), de glucose 0,5 p. 100, de protéose-peptone 0,1 p. cent (Difco n° 0 121-01) et de chlorure de sodium 0,1 p. cent, de pH 6,8.

Résultats et discussion

Conditions d'adsorption

Nous avons successivement étudié l'influence de l'état de la résine, du temps de contact, du pH d'adsorption et de la concentration d'enzyme mise en présence de la résine.

1. *Influence de l'état de la résine*

Après lavage avec le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, la résine a ou non été séchée avant mise en contact avec la solution enzymatique. L'adsorption a été faite à pH 4, pendant 12 h, à 4 °C. Pour déterminer si ce séchage préalable a une influence sur l'activité enzymatique mesurée après adsorption, vis-à-vis d'une solution de maltodextrines 25 p. 100 (*p/v*), à 40 °C, on calcule dans les deux cas le rendement par le rapport suivant :

$$\frac{\left[\begin{array}{l}\text{Activité de l'enzyme soluble}\\ \text{mise en contact avec la résine}\end{array}\right] - \left[\begin{array}{l}\text{Activité enzymatique re-}\\ \text{trouvée dans les surnageants}\\ \text{de lavage de la résine}\end{array}\right]}{\left[\begin{array}{l}\text{Activité initiale de l'enzyme}\\ \text{soluble mise en contact avec}\\ \text{la résine}\end{array}\right]}$$

Les résultats indiquent un rendement d'adsorption de 45 p. 100 environ avec la résine préalablement séchée et de 35 p. 100 environ avec une résine non séchée (contenant en moyenne 180 p. cent d'eau par rapport à la résine sèche).

La différence entre les rendements d'adsorption d'enzyme sur la résine respectivement séchée ou non, pourrait être interprétée par l'effet de dilution dû à l'eau de la résine non séchée; c'est en effet la concentration en enzyme qui régit la proportion de l'enzyme totale adsorbée sur le support (voir plus loin).

2. *Influence du temps de contact*

La cinétique d'adsorption a été étudiée à 4 °C. Le pH d'adsorption était de 4 et la quantité d'enzyme mise en œuvre est de 6167 UI/g de résine sèche. L'activité enzymatique adsorbée est exprimée en pourcentage de l'activité adsorbée maximum. Elle est mesurée vis-à-vis d'une solution de maltodextrines à 25 p. 100 (*p*/*v*), en tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4 à 25 °C. Les résultats donnés sur la figure 1 montrent que le maximum d'adsorption de l'activité enzymatique est atteint au bout de 5 h dans ces conditions expérimentales.

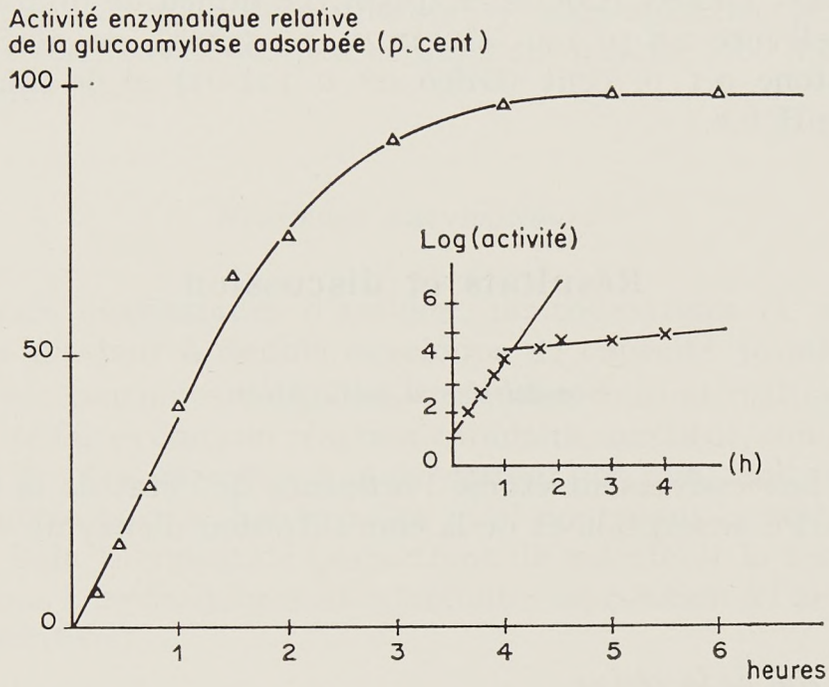


FIG. 1. — *Influence du temps de contact sur l'adsorption de glucoamylase Novo sur la résine IRA 93.*
L'adsorption a été faite à 4 °C. L'activité enzymatique a été mesurée vis-à-vis d'une solution de maltodextrines 25 p. cent (*p*/v), tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 25 °C.

La transformation semi-logarithmique (fig. 1) montre 2 parties rectilignes, de pentes différentes. Ceci n'est pas incompatible avec un processus d'adsorption en 2 étapes successives, chacune étant d'ordre apparent égal à 1, et la première étant plus rapide que la seconde.

D'après MESSING (1969), l'adsorption de protéines sur verre poreux semble se faire, en effet, en 2 phases; la première dépend surtout de la charge électrique de la protéine, la seconde dépend de la masse molaire : la vitesse semble inversement proportionnelle à la taille de la molécule protéique.

3. *Influence du pH*

L'efficacité de l'adsorption d'une protéine sur une résine échangeuse d'ions peut dépendre des charges électriques respectives. Des échantillons de 2 g de résine ont été équilibrés à différents pH et mis en contact avec la solution de glucoamylase Novo (0,75 ml de la préparation enzymatique initiale par g de résine sèche) à ces mêmes pH. L'activité des différents échantillons a alors été mesurée à pH 4 (tam-

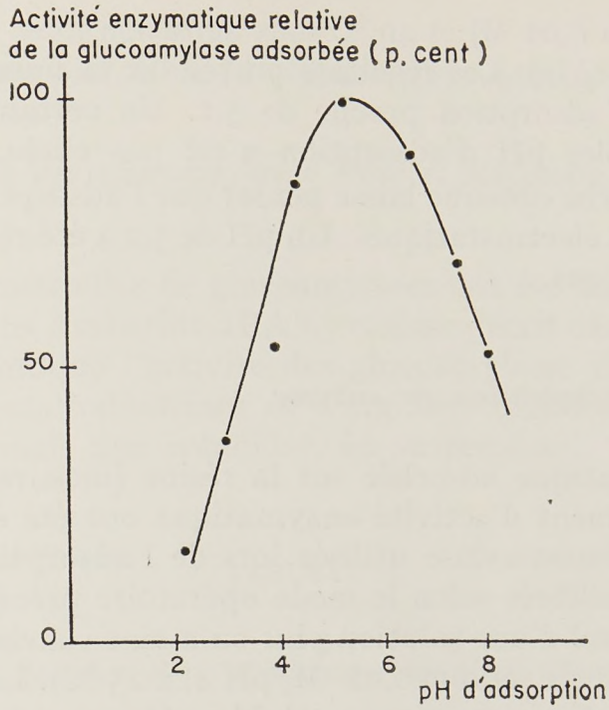


FIG. 2. — *Influence du pH d'adsorption sur l'activité enzymatique à pH 4 de la glucoamylase adsorbée.*

L'activité a été mesurée en tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 40 °C, maltodextrines 25 p. cent (*p/v*).

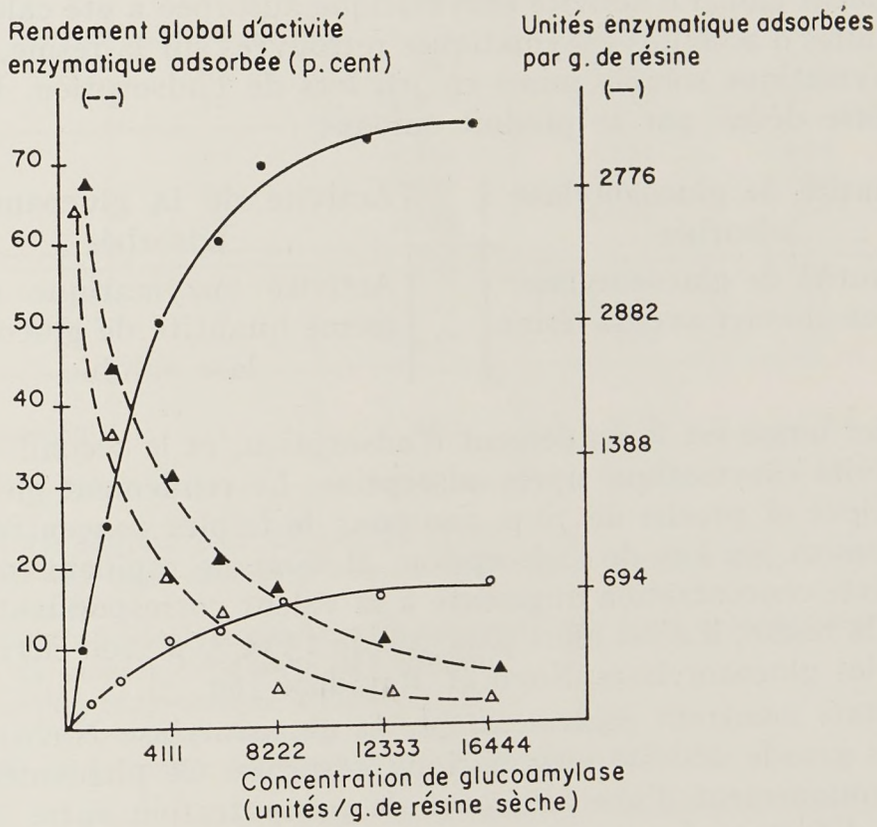


FIG. 3. — *Activité enzymatique adsorbée et rendement global d'activité enzymatique adsorbée en fonction de la concentration d'enzyme soluble utilisée.*

Glucoamylase Novo 150L (▲, ●).
Glucoamylase Rapidase (△, ○).
Activité enzymatique mesurée en tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, contenant 25 p. cent (*p/v*) de maltodextrines, 25 °C.

pon acétate de sodium 0,01 M) et 40 °C sous agitation avec une solution de maltodextrines à 25 p. 100 (*p/v*). Les résultats portés sur la figure 2 indiquent qu'il y a un pH optimum d'adsorption proche de 5,2. Un certain degré d'inactivation de l'enzyme aux faibles pH d'adsorption n'est pas exclu.

L'allure de la courbe obtenue laisse penser que l'adsorption ne dépend pas uniquement d'attractions électrostatiques. Un pH de 5,2 a été retenu pour l'adsorption dans la plupart des cas.

4. *Influence de la concentration en enzyme*

L'activité enzymatique adsorbée sur la résine (mesurée sur substrat maltodextrines) et le rendement d'activité enzymatique ont été étudiés en fonction de la concentration de glucoamylase utilisée lors de l'adsorption. Pour cela, 2 g de résine séchée, puis équilibrée selon le mode opératoire précédemment décrit, sont mis en contact avec 5 ml d'une solution plus ou moins concentrée en glucoamylase (dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, à 25 °C). Les résultats montrent que pour des concentrations en enzyme soluble inférieures à 8 222 UI/g de résine, l'activité enzymatique adsorbée sur la résine croît linéairement avec la concentration en enzyme soluble mise en œuvre (fig. 3). Au-delà, l'activité enzymatique adsorbée atteint rapidement un palier qui correspondrait à une saturation des sites d'adsorption. La valeur de ce palier diffère d'une enzyme à l'autre; il est égal à 694 et 3 050 UI/g de résine, respectivement pour les glucoamylases Rapidase (Amigase 50) et Novo (Novo 150 L).

Le rendement global d'activité enzymatique adsorbée a été calculé comme le rapport des unités d'activités enzymatiques retrouvées sur la résine, sur les unités d'activité enzymatique soluble mises en jeu lors de l'adsorption. Ce rendement global peut être défini par le produit suivant :

$$\left[\frac{\text{Quantité de glucoamylase adsorbée}}{\text{Quantité de glucoamylase mise en contact avec la résine}}\right] \times \left[\frac{\text{Activité de la glucoamylase adsorbée}}{\text{Activité enzymatique d'une même quantité de glucoamylase soluble}}\right]$$

dont le premier terme est le rendement d'adsorption, et le second terme, le rendement d'activité enzymatique après adsorption. Le rendement global d'activité adsorbée est élevé et proche de 70 p. 100 pour de faibles concentrations de glucoamylase mises en jeu lors de l'adsorption. Il diminue rapidement au fur et à mesure que cette concentration augmente à la valeur correspondant au palier de saturation de la résine; il n'est alors plus que de 15 et 5 p. 100 environ pour, respectivement, les glucoamylases Novo et Rapidase (fig. 3).

Les résultats montrent également que la glucoamylase Novo permet d'obtenir une plus grande activité enzymatique adsorbée. Ce phénomène ne semble pas provenir uniquement d'une différence de concentration entre les 2 préparations, ni d'une différence de pureté puisque l'activité spécifique de la glucoamylase Novo (143 UI/mg) est inférieure à celle de la glucoamylase Rapidase (184 UI/mg). La glucoamylase Novo a été retenue dans la plupart des cas pour la mise au point de réacteurs enzymatiques continus.

Propriétés de la glucoamylase adsorbée

1. *Activité enzymatique des glucoamylases Novo et Rapidase libres et adsorbées sur divers substrats*

Les solutions industrielles de glucoamylases ont été adsorbées à pH 4 sur la résine échangeuse d'ions Amberlite IRA 93 comme décrit dans « Matériel et Méthodes ». Le tableau 1 indique l'activité des glucoamylases libres et adsorbées vis-à-vis de maltose, de maltodextrines et d'amidons (amidon de maïs solubilisé à chaud et amidon de maïs non solubilisé, en suspension).

TABLEAU I

Activités enzymatiques comparées des glucoamylases Novo et Rapidase libres et adsorbées sur divers substrats

Substrats	Concentrations p. cent (*p*/*v*)	Glucoamylases solubles		Glucoamylase adsorbée	
		Rapidasse UI/ml	Novo UI/ml	Rapidasse UI/g	Novo UI/g
Maltose	12	13 333	14 444	722	4 444
	15	13 889	15 555	833	5 000
	30	11 389	13 055	578	3 555
Maltodextrine	10	4 444	5 833	444	2 778
	20	6 667	8 889	555	3 222
	25	5 555	8 222	500	3 000
Amidon soluble	1	8 889	13 333	167	944
	5	11 111	14 444	111	667
	10	6 111	7 500	55	333
Amidon en suspension	1	167	333	2,8	17

Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 25 °C.
La quantité d'enzyme mise en œuvre lors de l'adsorption était de 6167 UI de glucoamylase/g de résine sèche.
Évaluation du taux d'hydrolyse par la méthode au D.N.S. (sauf avec le substrat maltose où la méthode à la glucose-oxydase a été utilisée).
Le temps de réaction enzymatique a été de 30 mn.
L'amidon en suspension dans l'eau est un amidon de maïs.
L'amidon soluble est le même amidon après solubilisation à 80 °C.

Les résultats montrent une activité adsorbée non négligeable. Cette activité adsorbée est d'autant plus forte que le substrat a une faible masse moléculaire. Les résultats confirment également la supériorité de la glucoamylase Novo par rapport à celle de Rapidase en ce qui concerne l'activité adsorbée.

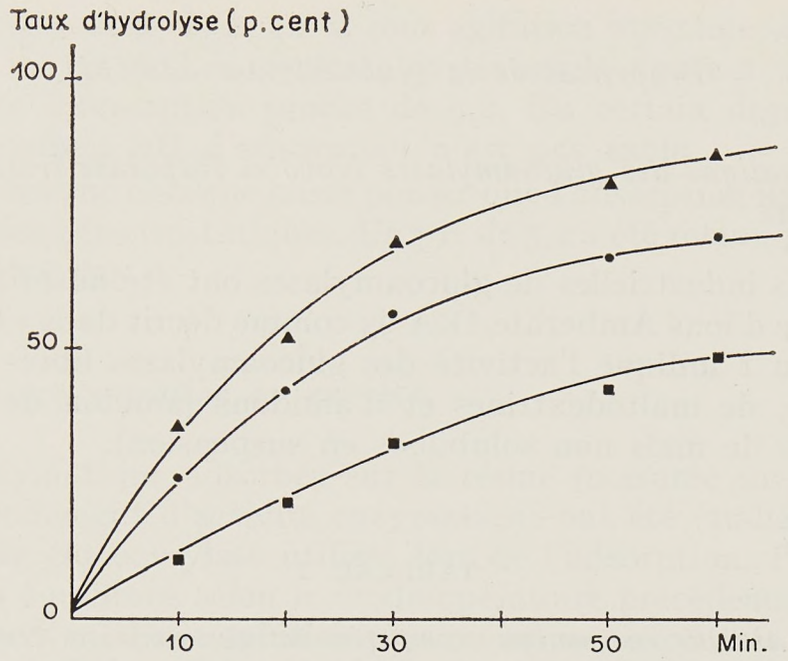


FIG. 4. — *Hydrolyse discontinue de divers substrats par la glucoamylase Novo soluble.*
Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 40 °C, 89UI/ml.
(■—■) Maltose 1 p. cent (*p/v*).
(●—●) Maltodextrine 1 p. cent (*p/v*).
(▲—▲) Amidon de maïs en solution 1 p. cent (*p/v*).

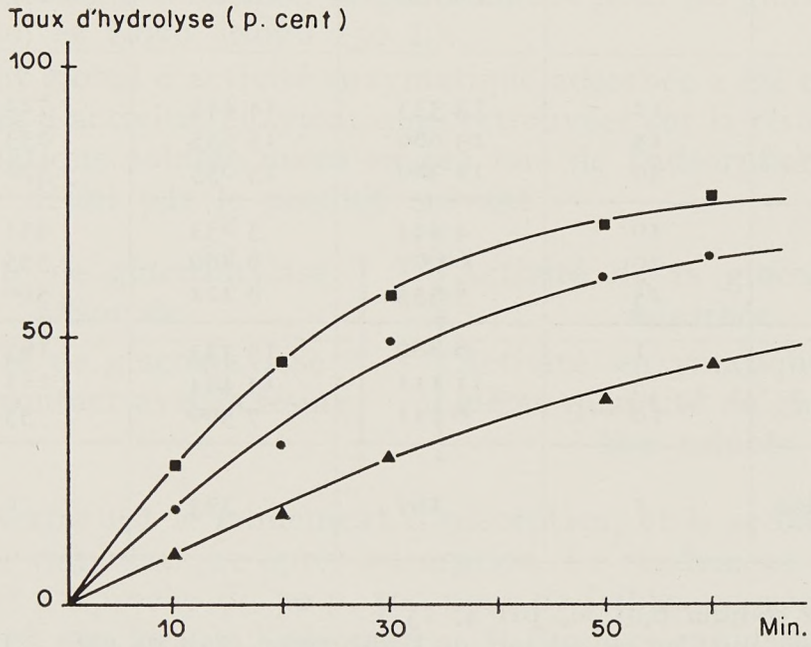


FIG. 5. — *Hydrolyse discontinue de divers substrats par la glucoamylase Novo adsorbée sur résine sèche IRA 93.*
Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 40 °C, 6167 UI de glucoamylase/g de résine sèche.
(▲—▲) Amidon de maïs en solution 1 p. cent (*p/v*).
(●—●) Maltodextrines 1 p. cent (*p/v*).
(■—■) Maltose 1 p. cent (*p/v*).

La cinétique d'hydrolyse de ces divers substrats par la glucoamylase Novo soluble et adsorbée a été étudiée à une concentration fixe en substrat, en tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, à 40 °C. Les résultats sont indiqués sur les figures 4 et 5. On peut noter que dans le cas de l'enzyme soluble, la durée de réaction nécessaire pour obtenir un taux d'hydrolyse donné, est d'autant plus grande que la

masse moléculaire est faible, tandis que c'est l'inverse qui s'applique dans le cas de l'enzyme adsorbée.

Des constatations semblables ont été faites par KING (1967) et par GRUESBECK et RASE (1972), et pourraient s'expliquer par une restriction de la libre diffusion dans la résine des substrats de masse moléculaire élevée (voir ZABORSKY, 1973; GOLDSTEIN et KATCHALSKI, 1976).

Cette « hiérarchie » n'est pas modifiée si on fait subir aux résultats une correction pour compenser le degré différent de saturation de l'enzyme par les 3 substrats, compte tenu des Km respectifs.

2. *Stabilité thermique de l'enzyme adsorbée*

La stabilité thermique des glucoamylases Novo et Rapidase libres et adsorbées (sur résine IRA 93) a été étudiée par incubation dans un tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, à diverses températures.

L'activité enzymatique est mesurée sur substrat maltodextrines, à pH 4, après incubation. Les résultats sont indiqués sur les figures 6 et 7. L'activité enzymatique de la glucoamylase Novo libre ou adsorbée est stable à 30 °C; une baisse d'activité intervient à des températures égales ou supérieures à 40 °C, et d'autant plus rapidement que la température est élevée. D'autre part, la glucoamylase Rapidase, libre ou adsorbée, est nettement moins stable que l'enzyme Novo; une baisse d'activité enzymatique intervient déjà à 30 °C. Ces résultats montrent aussi que l'adsorption des glucoamylases augmente leur stabilité thermique. Ce phénomène est d'autant plus intéressant qu'il n'est pas général (BACHLER, STRANDBERG et SMILEY, 1970; GOLDMAN *et al.*, 1968). Dans le cas présent, la stabilité thermique de l'enzyme adsorbée à 40 °C montre qu'il n'y a pratiquement pas de désorption à cette température.

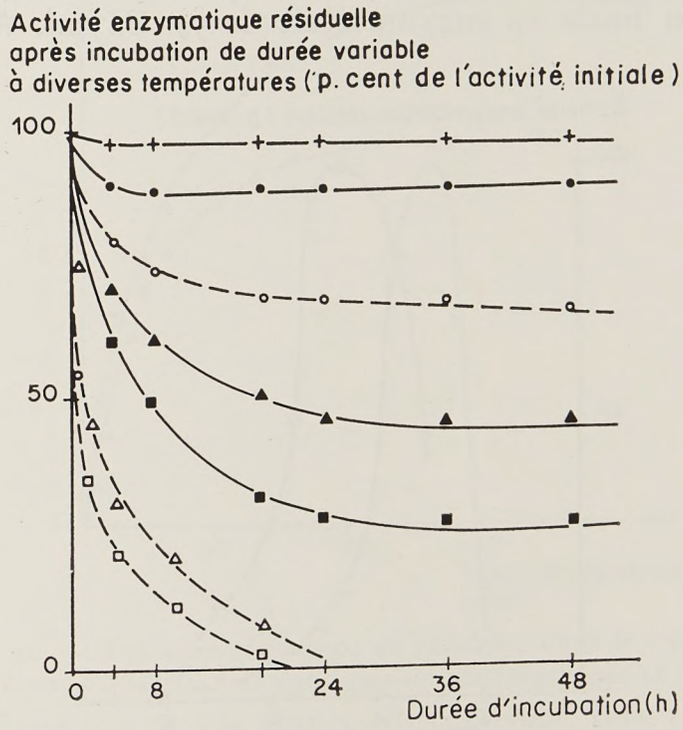


FIG. 6. — *Stabilité thermique de la préparation de glucoamylase Novo (150 L) libre ou adsorbée*

Enzyme adsorbée (—) à 30 °C (+), 40 °C (●), 50 °C (▲) et 60 °C (■).
Enzyme libre (— —) à 40 °C (○), 50 °C (△) et 60 °C (□).

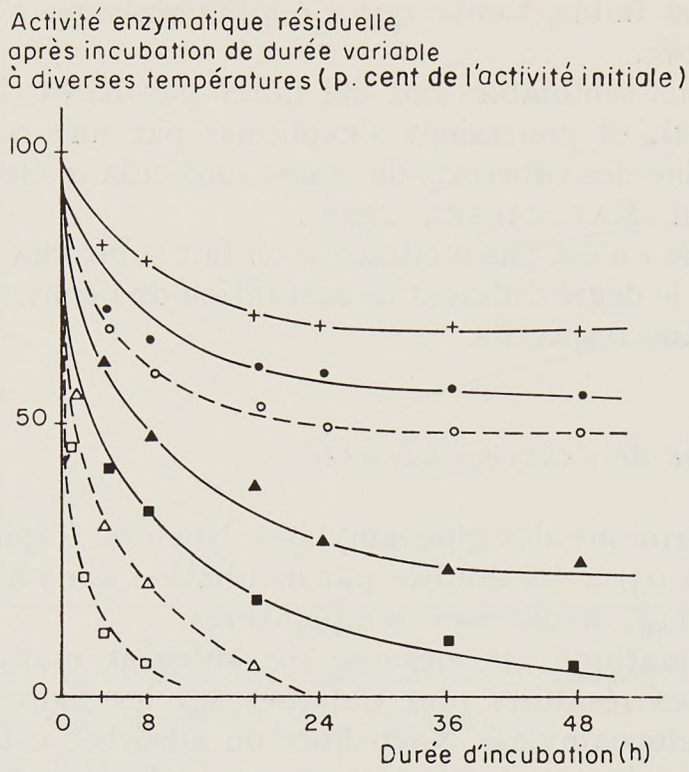


FIG. 7. — *Stabilité thermique de la préparation de glucoamylase Rapidase (Amigase 50) libre ou adsorbée.*

Enzyme adsorbée (—) à 30 °C (+), 40 °C (●), 50 °C (▲), et 60 °C (■).
Enzyme libre (— — —) à 40 °C (○), 50 °C (△) et 60 °C (□).

3. *Influence du pH sur l'activité enzymatique adsorbée*

Le pH optimum de l'enzyme soluble Novo a été déterminé à 40 °C sur substrat maltodextrines en solution à 25 p. 100 (*p/v*) dans divers mélanges tampon acétate de sodium 0,01 M (pH 2 à 5,5), ou phosphate de sodium 0,01 M (pH 5,5 à 7). La concentration finale en enzyme était de 77 UI/ml. Ainsi que le montre

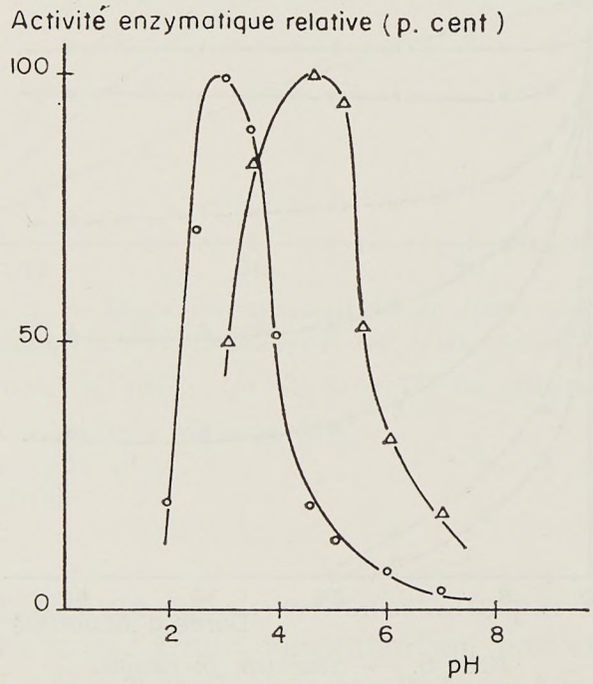


FIG. 8. — *Influence du pH sur l'activité enzymatique.*

(●—●) Enzyme adsorbée, (▲—▲) enzyme soluble. Tampon acétate ou phosphate 0,01 M, 40 °C. Glucoamylase Novo.

la figure 8, le pH optimum d'activité enzymatique est proche de 4,6. Pour la glucoamylase adsorbée (pH d'adsorption de 5,2, quantité d'enzyme mise en œuvre à l'adsorption 6167 UI/g de résine sèche), le pH optimum d'activité enzymatique est proche de 3 (fig. 8). On observe donc un déplacement de 1,6 unité pH vers les pH acides après adsorption. Ce phénomène bien connu (voir BOUDRANT et CHEFTEL, 1975, et O'NEILL, DUNNILL et LILLY, 1971) peut être interprété comme le résultat d'une distribution inégale des ions hydrogène et hydroxyle entre « la phase ionique » de la résine anionique où l'enzyme est adsorbée et la solution externe. D'autre part, ce phénomène présente un intérêt pratique dans la mesure où il est possible d'utiliser des solutions de substrat à un pH suffisamment bas pour réduire le risque de croissance de microorganismes. Cependant, une étude complémentaire a montré que l'enzyme Novo libre ou adsorbée n'est pas stable de manière prolongée en dessous de pH 4. Un pH de 4 a donc été retenu pour la suite de cette étude.

Hydrolyses continues en réacteur tubulaire

1. *Hydrolyse de courte durée*

Des hydrolyses continues de courte durée ont été réalisées afin de déterminer l'influence du temps de résidence des solutions de maltose, maltodextrines et amidon dans le réacteur tubulaire sur le taux d'hydrolyse. Lors de ces expériences, le lit fixe du réacteur était constitué par 150 g de résine sèche occupant un volume total de 300 ml dans un réacteur tubulaire de diamètre intérieur 35 mm et de hau-

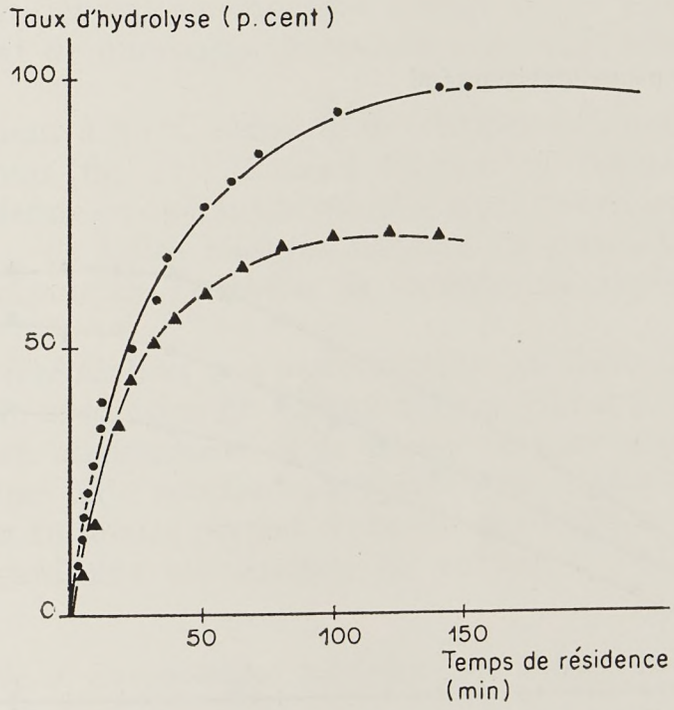


FIG. 9. — *Influence du temps de résidence dans le réacteur sur le taux d'hydrolyse de solutions de maltodextrines et amidon.*

Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 40 °C. Glycoamylase Novo 150L adsorbée sur résine Amberlite IRA 93. Le lit fixe du réacteur est constitué par 150 g. de résine (6167 UI de glucoamylase Novo/g de résine sèche).

(●—●) Maltodextrine 25 p. cent (*p/v*).
(▲—▲) Amidon de maïs en solution 1 p. cent (*p/v*).

teur 650 mm. Le volume mort (*vo*) du réacteur, déterminé à l'aide d'une solution de Bleu Dextran 2000, a été trouvé égal à 150 ml environ. La quantité de glucoamylase Novo 150 L, utilisée pour l'adsorption, était de 6167 UI/g de résine. Le réacteur a été maintenu à 40 °C. Le taux d'hydrolyse est mesuré en sortie de réacteur après écoulement de 1 500 ml de solution de substrat, soit 10 fois le volume mort du réacteur (ce qui assure l'établissement d'un régime stationnaire).

La figure 9 montre que le taux d'hydrolyse de maltodextrines, 25 p. 100 (*p*/*v*), croît avec le temps de résidence $\left(\text{égal à } \frac{vo}{\text{débit}}\right)$, et atteint une limite proche de 100 p. 100 lorsque le temps de résidence dépasse 100 min.

Lors d'une expérience analogue d'hydrolyse d'amidon de maïs en solution à 1 p. 100 (*p*/*v*), le taux d'hydrolyse est de 70 p. 100, pour un temps de résidence des solutions dans le réacteur de 100 min (fig. 9).

Dans le cas d'une hydrolyse de maltose 12 p. 100 (*p*/*v*), les résultats obtenus montrent que l'on atteint un taux d'hydrolyse de 95 p. 100 avec un temps de résidence voisin de 100 min.

2. *Stabilité microbiologique du réacteur lors d'utilisation prolongée*

Avant de réaliser des essais de longue durée, nous avons étudié la stabilité microbiologique du réacteur à glucoamylase adsorbé au cours de l'hydrolyse d'une solution de maltodextrine 25 p. 100 (*p*/*v*) à pH 4, à 30, 40 et 50 °C. Le dénombrement des microorganismes totaux en sortie de réacteur a été fait chaque jour pendant 15 jours. Il a été préalablement établi que le nombre de microorganismes dans la solution d'alimentation (renouvelée toutes les 24 h), est inférieur à 10^5 microorganismes par ml.

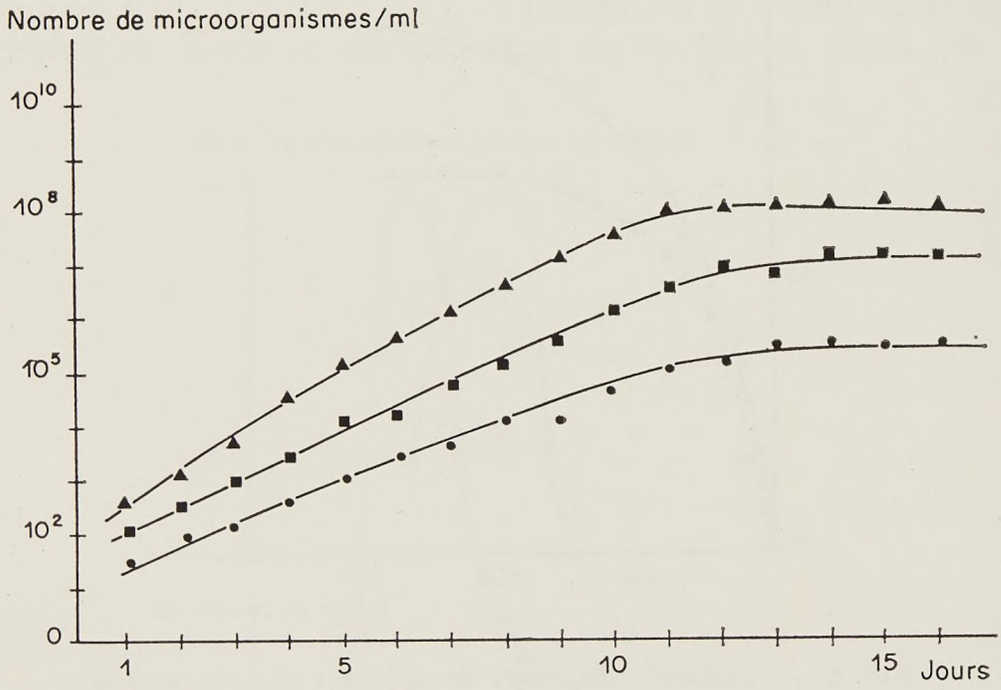


FIG. 10. — *Influence de la température de fonctionnement du réacteur sur la teneur en microorganismes des solutions de maltodextrines hydrolysées.*

Solution de maltodextrines 25 p. cent dans un tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4.
Le lit fixe du réacteur est constitué par 5,5 g de résine (6167 UI de glucoamylase Novo/g de résine sèche).
Temps de résidence dans le réacteur 15 mn. (▲) 30 °C, (■) 40 °C, (●) 50 °C.

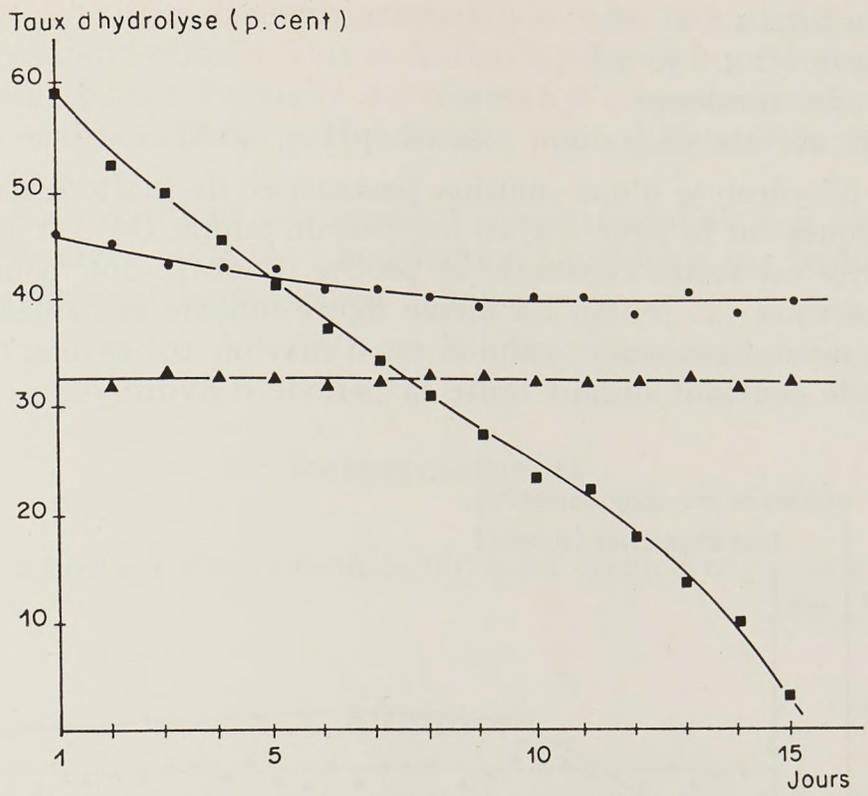


FIG. 11. — *Variation du taux d'hydrolyse en fonction de la température de fonctionnement du réacteur.*

Solution de maltodextrine 25 p. cent (*p/v*) dans tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4 ; glucoamylase Novo (6167 UI/g de résine sèche).
Lit fixe du réacteur : 5,5 g de résine, temps de résidence dans le réacteur : 15 mn.
(▲) 30 °C, (●) 40 °C, (■) 50 °C.

Les résultats des dénombrements sont donnés sur la figure 10. Ils montrent qu'un développement de microorganismes très important intervient malgré le pH relativement bas.

Le fonctionnement à 50 °C réduit le développement, mais abaisse également l'activité enzymatique (fig. 11). Il serait vraisemblablement possible de réduire la croissance microbienne en opérant le réacteur à pH 3 et en augmentant la concentration en substrat : de telles mesures risquent de provoquer, la première une inactivation assez rapide de l'enzyme, la seconde, un abaissement de l'activité enzymatique.

Nous avons préféré réaliser une pasteurisation préalable des solutions de substrat. Un chauffage de la solution de maltodextrines (pH 4) à 80-85 °C, pendant 5 à 10 min, provoque un abaissement de la teneur en microorganismes de 10^5/ml à 10-100/ml. Avec une telle solution pasteurisée de maltodextrines, l'hydrolyse continue en réacteur tubulaire permet d'obtenir des solutions hydrolysées dont la teneur en microorganismes est environ de 10^4/ml.

3. *Stabilité de l'activité enzymatique adsorbée lors d'utilisation prolongée*

Un réacteur enzymatique ne présente un intérêt pratique que si l'activité est maintenue pendant une période de temps suffisante. Après les contrôles microbiologiques, nous avons étudié la stabilité de l'activité enzymatique en fonction du temps dans les conditions expérimentales suivantes :

— lit fixe du réacteur : 150 g de résine sèche (6167 UI de glucoamylase/g de résine sèche),

— volume total : 300 ml,
— volume mort : 150 ml,
— temps de résidence : 50 mn,
— tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 40 °C.

Les taux d'hydrolyse d'une solution pasteurisée de maltodextrines 25 p. 100 (*p/v*) sont indiqués sur la figure 12, en fonction du temps. On voit que la valeur du taux d'hydrolyse est restée constante et proche de 70 p. 100 pendant toute la durée de l'expérience (30 jours). La même figure montre également la variation du nombre de microorganismes : celui-ci est d'environ 10^4 germes/ml au bout de 10 jours et reste constant durant toute la période d'hydrolyse.

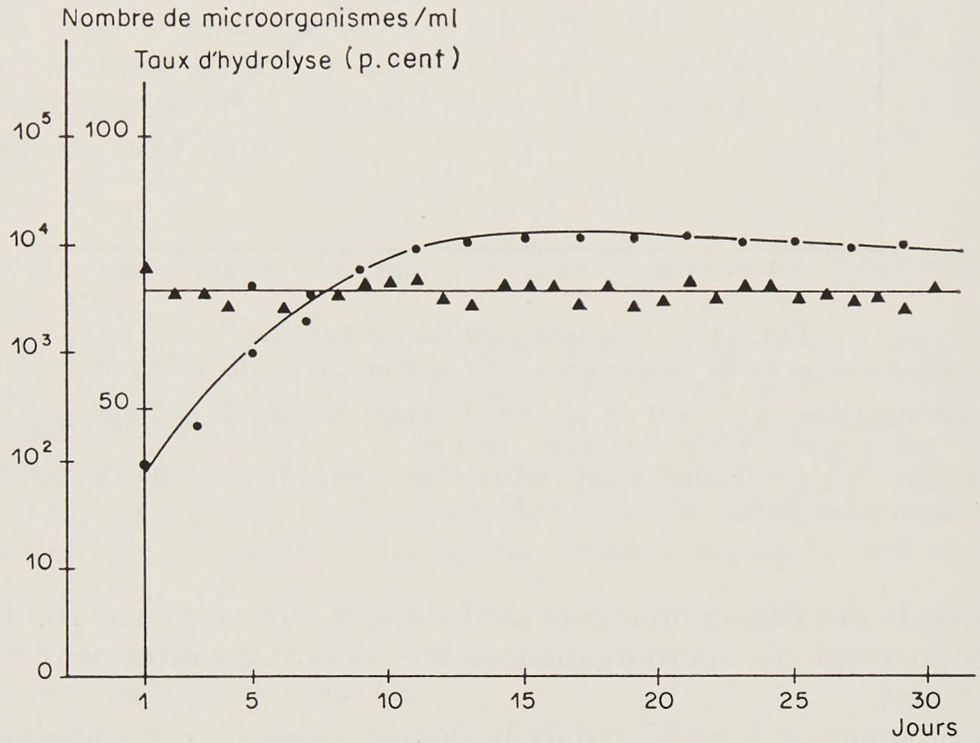


FIG. 12. — *Taux d'hydrolyse mesuré en sortie de réacteur en fonction du temps.*

Le réacteur a fonctionné en tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4. 40 °C avec une solution de maltodextrines 25 p. 100 (*p/v*). Lit fixe du réacteur : 150 g de résine (6167 UI de glucoamylase Novo/g de résine sèche); temps de résidence : 50 min.

(▲—▲) Taux d'hydrolyse.
(●—●) Nombre de microorganismes.

Des expériences similaires ont été effectuées avec des solutions de maltose 12 p. 100 (*p/v*) et d'amidon 1 p. 100 (*p/v*) dans les mêmes conditions expérimentales; des taux d'hydrolyse proches de 40 et 50 p. 100 sont respectivement obtenus; ils restent relativement constants pendant 15 jours.

Conclusions

Cette étude montre qu'il est possible de fixer la glucoamylase de manière stable par simple adsorption sur une résine anionique.

L'enzyme adsorbée peut être placée dans une colonne et constituer un réacteur tubulaire permettant l'hydrolyse continue de solutions relativement concen-

trées (25 p. cent *p/v*) de maltodextrines de DE = 4-5. Un taux d'hydrolyse proche de 100 p. 100 peut être obtenu. Une opération à pH 4 et à 40 °C pendant 30 jours n'entraîne aucune baisse d'activité du réacteur. Une pasteurisation préalable de la solution de maltodextrines est nécessaire pour maintenir la stabilité microbiologique.

L'hydrolyse de solutions relativement concentrées d'amidon dans ce réacteur ne peut être envisagée qu'après « liquéfaction » préalable par hydrolyse partielle acide ou enzymatique (α-amylases solubles).

Reçu pour publication en janvier 1978.

Remerciements

Cette étude a bénéficié d'une aide de la D.G.R.S.T. (contrat n° 72.7.0851).

Summary

Tubular enzyme reactor using glucoamylase adsorbed onto an anionic resin. Application to maltodextrin hydrolysis

1. The optimum conditions were determined for adsorption of a commercial glucoamylase (E.C.3.2.1.3.) preparation (from *Aspergillus niger*) onto an ion exchange resin (Amberlite IRA 93). It is preferable to dry the resin before use. The optimum adsorption pH is 5.2. A contact time of 5 hours (at 4 °C) is necessary to obtain maximum adsorbed enzyme activity. The adsorbed enzyme activity increases with the initial concentration of the enzyme solution used, reaching a maximum value. The overall yield of adsorbed enzyme activity (adsorbed activity / initial activity used) decreases progressively as this maximum is approached.

2. The properties of adsorbed glucoamylase have been studied. The adsorbed enzyme remains highly active in the presence of maltose and maltodextrin solutions and dilute starch solutions. The thermal stability of the enzyme is slightly enhanced by adsorption; almost no desorption or no inactivation is induced by incubating the adsorbed enzyme in pH 4 sodium acetate buffer at 40 °C for 48 hours. Incubation at pH 3, however, causes a loss of activity. The optimum pH of the adsorbed and free enzymes are 3 and 4.6, respectively. At pH 4, the adsorbed enzyme retains about 50 per cent of its activity at pH 3.

3. A tubular reactor charged with adsorbed glucoamylase has been used for continuous hydrolysis of solutions containing maltose (12 p. cent *w/v*), maltodextrins (25 p. cent *w/v*), and starch (1 p. cent *w/v*). The extent of hydrolysis of glycosidic bonds reached 70-100 p. 100 for a residence time of 100 mn in the reactor. The microbiological stability of the reactor can be maintained for an extended length of time if substrate solutions are pasteurised. Under these conditions, continuous hydrolysis of maltodextrin solutions (DE 4-5) at 25 p. 100 (*w/v*) have been carried out for 30 days at pH 4 and 40 °C with a residence time of 50 mn. The extent of hydrolysis remained constant and equal to 70 p. 100.

Références bibliographiques

Bachler M. S., Strandberg G. W., Smiley K. L., 1970. Starch conversion by immobilized glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 86-92.

Barfoed H. C., 1976. Enzyme in starch processing. *Cereal Food World*, **21**, 588-604.

Bellal M. M., 1975. Hydrolyse continue d'amidon par des amylases immobilisées sous forme soluble. Diplôme d'études approfondies de Biochimie, Montpellier.

BELLAL M. M., BOUDRANT J., CHEFTEL C., 1976. *Glucoamylase immobilisée sur résine échangeuse d'ions. Procédé d'obtention et application.* Brevet d'invention ANVAR, n° 76.36.477.

BERNFELD P., 1955. *Amylases Methods in Enzymology.* Ed. PERLMAN G. et LORAND L., **1**, 149.

BOUDRANT J. et CHEFTEL C., 1973*a*. Hydrolyse continue du saccharose par l'invertase immobilisée sous forme soluble. *Biochimie*, **55**, 413-421.

BOUDRANT J. et CHEFTEL C., 1973*b*. *Invertase immobilisée sur résine échangeuse d'ions. Procédé d'obtention et application.* Brevet d'invention ANVAR, n° 73.21.933.

BOUDRANT J. et CHEFTEL C., 1975. Continuous hydrolysis of sucrose by invertase adsorbed in tubular reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 827-844.

BRILLOUET J. M., COULET P. R. et GAUTHERON D. C., 1976. Thin layer-flow reactor with amyloglucosidase bound to collagen membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1821-1825.

BRILLOUET J. M., COULET P. R. et GAUTHERON D. C., 1977. Chemically activated collagen for amyloglucosidase attachment. Use in helicoidal reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 125-142.

BUTTERWORTH T. A., WANG D. I. C. et SINSKEY A. J., 1970. Application of ultrafiltration for enzyme retention during continuous enzymatic reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 615-623.

CALDWELL K. D., AXEN R., BERGWALL M., PORATH J., 1976. Immobilization of enzyme based on hydrophobic interaction. II. Preparation and properties of an amyloglucosidase adsorbate. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1589-1604.

COCHRAN W. G., 1950. Estimation of bacterial densities by means of the « most probable number ». *Biometrics*, **6**, 105.

CORNO C., GALLI G., MORISI F., 1972. Glucoamylase entrapped into cellulosic fibres. Properties and use. *Die Starke*, **28**, 420-424.

CUATRECASAS P. et ANFINSEN C. B., 1971. Affinity chromatography. *In Methods in Enzymology*, **22**, 345.

DELECOURT R., 1972. Utilisations industrielles des amylases. *Ind. Chim. Belge*, **37**, 1005-1011.

DEMAIN A. L., 1971. Over production of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation, in « Advances Biochemical Engineering », *Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New-York*, 113-142.

DINELLI D., MORISI F., CORNO C., 1972. Offenlegungsschrift, 21.46.390.

DURAND G., BAUDRAS A., 1975. Les enzymes immobilisées. *La Recherche*, **56**, 437-446.

DURAND G., MONSAN P., 1975. Les enzymes immobilisées et leurs applications. Ed. C.D.I.U.-P.A., Paris.

FORGARTY W. M., GRIFFIN P. J. et JOYCE A. M., 1974. Enzymes of Bacillus species. *Part I. Process Biochem.*, **9**, 11-18.

FUKUI T. et NIKUNI Z., 1969. Preparation and properties of crystalline glucoamylase from Endomyces species. IFOO 111. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 884-891.

GOLDMAN R., KEDAM O., SILMAN I. H., CAPLAN S. R. et KATCHALSKI E., 1968. Papain collodion membranes: preparation and properties. *Biochemistry*, **7**, 486-500.

GOLDSTEIN L. et KATCHALSKI KATZIR E., 1976. The chemistry of enzyme immobilization, in « Applied Biochemistry and Bioeng. » Vol. 1. Ed. J. R. WINGARD, E. KATCHALSKI KATZIR, GOLDSTEIN L., *Eds. Acad. Press. Inc.*, 23-126.

GREENWOOD C. T. et MILNE E. A., 1968. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. *Adv. Carbohyd. Chem.*, **23**, 281-366.

GRUESBECK C. et RASE H. F., 1972. Immobilized glucoamylase enzyme system for continuous production of dextrose. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, **11**, 74-83.

GRYSKIEWICZ J., 1971. Insoluble enzymes. *Folia Biologica*, **19**, 120-150.

GUILBAULT G. G. et KRAMER D. N., 1972. Analytical uses of immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **3**, 361-376.

GUILBOT A., 1968. Dégradation enzymatique de l'amidon. *Actualités Scientifiques et Industrielles.* HERMANN ed., Paris.

KAISER P., 1971. L'amylolyse bactérienne. *Bull. Inst. Pasteur*, **69**, 153-188.

KAWASHIMA K., UMEDA K., 1976. Studies on the preparation of immobilized enzymes by radiopolymerization. Part VII. Preparation of bead shaped glucoamylase and its characteristics. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **23**, 316-321.

KEERE W., CLEVELAND F. C., ICATZEBCK W. J., 1951. The action of amyloglucosidase on amylose and amylopectine. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3916-3921.

KING N. J., 1967. The glucoamylase of Coniophora cerebella. *Biochem. J.*, **105**, 577-583.

KINGMA Tr. W. C., 1966. Starch conversion process. *Process Biochemistry*, **4**, 49-52.

KOMAKI T., 1968. Studies on enzymatic liquefaction and saccharification of starch. *Part VI. Agr. Biol. Chem.*, **32**, 123.

KUCERA J., 1976. Continuous hydrolysis of soluble starch by immobilized amyloglucosidase. *Collection Czechoslov. Chem. Comm.*, **41**, 2978-2986.

LEE D. D., LEE Y. Y. et TSAO G. T., 1975. Continuous production of glucose from dextrin by glucoamylase immobilized on porous silica. *Die Starke.* **27**, 384-387.

LEE D. D., LEE Y. Y., REILLY P. E., COLLINS J. R. et TSAO G. T., 1976. Pilot plant production of glucose with glucoamylase immobilized to porous silica. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 253-267.

LILLY M. D., DUNNILL P., 1971. Biochemical Reactors. *Process Biochem.*, **6**, 29-32.

MAEDA H. et SUZUKI H., 1970. Studies on the water insoluble enzyme Part I. General properties of CMC-glucoamylase. *J. Agr. Chem. Soc.* (Japon), **44**, 547-555.

MAEDA H. et SUZUKI H., 1972. On the activities of glucoamylase chemically fixed to cyanogen bromide — actived cellulose. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1839-1842.

MAEDA H. et SUZUKI H., 1973. Preparation of enzyme by electron beam irradiation. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 827-829.

MAEDA H., YAMAUCHI A., SUZUKI H., 1973. Preparation of immobilized enzyme by γ-ray irradiation. *Biochem. Biophys. Acta*, **315**, 18-21.

MARSH D. R., LEE Y. Y., TSAO G. T., 1973. Immobilized glucoamylase on porous glass. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 483-492.

MESSING R. B., 1969. Molecular inclusions. Adsorption of macromolecules on porous glass membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2370-2371.

OHGA M. K., SHIMIZU T. et MOKITA Y., 1968. Studies on amylases of *Aspergillus oryzae* on rice. II. Some properties of glucoamylases. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 867-972.

O'NEILL S. P., WYKES J. R., DUNNILL P. et LILLY M. D., 1971. An ultrafiltration reactor system using a soluble immobilized enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 319-322.

O'NEILL S. P., DUNNILL P. et LILLY M. D., 1971. Comparative study of immobilized amyloglucosidase in packed bed reactor and a continuous feed stirred tank reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 337-352.

PARK Y., LIMA D. C., 1973. Continuous conversion of starch to glucose by an amyloglucosidase resin complex. *J. Food Sci.*, **38**, 358-359.

PARK Y., 1974. Enzymic properties of fungal amyloglucosidase resin complex. *Hakko Kogaku Zasshi*, **52**, 140.

PAZUR J. H. et KLEPPE K., 1962. The hydrolysis of α-D-glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger. J. Biol. Chem.*, **237**, 1002-1005.

PAZUR H. J. et OKADA S., 1967. Properties of the glucoamylase from Rhizopus delemar. *Carbohyd. Res.*, **4**, 371-379.

PHILLIPS L. L. et CALDWELL M. L., 1951. A study of the purification and properties of a glucose forming amylase from Rhizopus delemar, glucoamylase. *J. Am. Soc.*, **73**, 3562-3568.

PYE K. E., 1974. Present and future trends in enzyme technology and its application. In « Immobilized Enzyme in Food Microbial Process ». Ed. C. OLSON et L. COONEY, Eds. Plenum Press, New-York and London, 1-18.

REED G., 1975. Enzyme in Food Processing. 2nd ed. Acad. Press. New-York.

RYSHAKOVA W. G. et FENIKSOVA R. W., 1972. Isolation of highly purified glucoamylase from *Aspergillus awanori. Biokhimiya*, **37**, 1019-1022.

SMILEY K. L., BOUNDY J. A., HOFREITER B. T. et ROGORIN S. P., 1974. Immobilized α-amylase for clarification of colloidal starch-clay suspensions. In « Immobilized Enzymes in Food and Microbial Process ». Ed. C. OLSON et L. COONEY eds. Plenum Press, New-York, 133-146.

SOLOMON B. et LEVIN Y., 1974. Studies on adsorption of amyloglucosidase on ion-exchange resins. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1161-1177.

SOLOMON B. et LEVIN Y., 1975. Adsorption of amyloglucosidase on inorganic carriers. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1323-1333.

SUZUKI S., AIZAWA S. et KARUBE I., 1975. Electrochemical preparation of enzyme-collagen membrane and its application. In « Immobilized Enzyme Technology, Research and Applications». Ed. H. H. WEETALL et S. SUZUKI eds. Plenum Press, New-York and London, 253-267.

TACHAUER J. T., COBB Y. T., SHAH Y. T., 1974. Hydrolysis of starch by mixture of enzyme in a membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 545-553.

UNDERKOFLER L. A., 1972. Enzymes in « Handbook of Food Additives ». Ed. THOMAS F. FURIA. *Chemical Rubber* Co. Cleveland. 2nd ed., 27-84.

WEETALL H. H., 1971. Enzymes immobilized on inorganic carriers. *Res. Develop.* ,**12**, 18-22.

WEETALL H. H. et HAVEWALA N. B., 1972. Continuous production of dextrose from cornstarch. A study of reactor parameters necessary for commercial application. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **3**, 241-246.

WEETALL H. H., HAVEWALA N. B., GARFINKEL H. M., BUEHL W.M. et BAUM G., 1974. Covalent bond between the enzyme amyloglucosidase and a porous glass carrier: the effect of shearing. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 169-179.

WEETAL H. H., VANN W. P., PITCHER W. H. Jr., LEE D. D., LEE Y. Y. et TSAO G. T., 1975. Scale-up studies on immobilized purified glucoamylase, covalently coupled to porous ceramic support. In « Immobilized Enzyme Technology, Research and Applications ». Ed. WEETALL H. H. et SUZUKI S. eds. Plenum Press, New-York and London, 269-297.

WILSON R. J. H. et LILLY M. D., 1969. Preparation and use of immobilized amyloglucosidase for production of sweet glucose liquors. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 349-362.

ZABORSKY O., 1973. Immobilized enzymes. CRC Press. Cleveland, U.S.A.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 489-500.

Détermination des paramètres de séchage de certains fruits compacts

R. BERTIN*, F. PIERRONNE* et M. COMBARNOUS**

* *Groupe de Recherche en Automatique Intégrée*
** *Laboratoire de Mécanique Physique*
(Équipe Associée au C.N.R.S. n° 769)
Université de Bordeaux I, 33405 Talence Cedex

Résumé

Dans le cadre d'un groupe de travail regroupant plusieurs organismes (1) nous avons été amenés à modéliser et simuler le séchage des prunes d'Ente en séchoir-tunnel. Bien qu'il soit possible d'obtenir directement à partir de mesures sur ces séchoirs-tunnel les paramètres caractéristiques du produit, il est plus commode et plus précis de déterminer ces paramètres sur des produits placés dans des étuves de laboratoire dans des conditions analogues au fonctionnement des séchoirs-tunnel. Ces simulations expérimentales en étuve nous ont permis d'obtenir les coefficients de transfert de chaleur et de masse. Le modèle mathématique du séchage, obtenu à partir des bilans thermiques et massiques, comprend les équations décrivant les transferts au sein du fruit supposé sphérique et à l'interface air-fruit. Des simplifications sont apportées à ce modèle, en considérant comme variables principales les valeurs moyennes de la teneur en eau et de la température du produit, ce qui permet d'obtenir un système d'équations différentielles non linéaires résolu par la méthode de Runge-Kutta-Gill d'ordre 4. Les paramètres à identifier, en particulier les coefficients de transfert de chaleur et de masse sont obtenus à partir de plusieurs méthodes d'optimisation qui sont comparées entre elles.

Mots clés : *séchage, fruits, paramètres physiques, modélisation, transferts de chaleur et de masse, optimisation, analyse expérimentale.*

I. — Introduction

Pour les besoins de la modélisation d'installation de séchage de certains produits agricoles (fruits, grains, etc.) il est nécessaire de disposer de paramètres physiques caractéristiques du produit à sécher. De tels paramètres, qui permettent en général de préciser les transferts de chaleur et de masse au sein du produit lui-

(1) Groupe de travail sur l'amélioration du séchage de la prune d'Agen : C.T.G.R.E.F. — I.N.R.A. — G.R.A.I.

même, sont les premiers éléments à rassembler pour la constitution d'un modèle qui comprend :

— les équations de conservation et lois de comportement décrivant les transferts au sein du fruit,
— l'écriture de conditions aux limites entre le produit à sécher et l'agent de séchage, de l'air chaud par exemple,
— les équations de conservation de masse et d'énergie à l'échelle de l'installation de séchage proprement dite.

Dans le cadre d'une action regroupant plusieurs organismes nous avons été amenés à travailler sur la modélisation et la simulation du séchage des prunes d'Ente (Bertin, Pierronne, 1976; Bertin, Pierronne, Combarnous, 1976). Les paramètres physiques, caractéristiques du comportement de ces fruits, introduits dans les modèles de tunnel ont été déterminés par un programme expérimental et un « ensemble de traitements » que nous exposons dans cet article, après un rappel des équations générales du séchage.

Nous noterons que, s'il est possible d'identifier les coefficients d'un modèle de séchage par une simulation directe de l'installation industrielle, il peut être en effet commode, voire plus précis, de déterminer les paramètres de séchage sur des produits placés, à cette fin, dans des étuves fonctionnant dans des conditions analogues à celle d'un tunnel de séchage.

2. — Description générale des transferts de chaleur et de masse

La technique de séchage à laquelle nous faisons référence ici est la plus fréquemment utilisée; les produits à sécher sont mis en contact avec de l'air relativement sec, suffisamment chaud pour élever la température et vaporiser une partie de l'eau qu'ils contiennent (Kneule, 1964; Lebedev, Ginzburg, 1971; Keey, 1972).

Le séchage dépend :

— des conditions d'évolution de la température et de l'humidité dans l'air, utilisé comme agent de séchage, en fonction des conditions hydrodynamiques et thermiques propres au tunnel,
— des conditions d'interface, entre l'air et le produit à sécher, caractérisées par des coefficients de transfert de chaleur et de masse. Ces coefficients, qui sont respectivement liés aux teneurs en eau de l'air et du fruit, dépendent des conditions thermiques et hydrodynamiques ainsi que des dimensions géométriques des produits,
— des transferts de chaleur et de masse au sein même des fruits.

En ce qui concerne ces derniers, il s'agit de transferts couplés. Dans l'équation décrivant le champ thermique au sein du fruit, un terme source, correspondant au changement d'état de l'eau, s'ajoute au terme classique de conduction. Le déplacement de l'eau au sein du produit s'effectue, quant à lui, sous forme liquide et éventuellement en fin de séchage sous forme gazeuse, sous l'effet des gradients de teneur en eau et de température. Ainsi la température θ_F et la teneur en eau W,

au sein du fruit, satisfont aux équations (LUIKOV, MIKHAILOV, 1965; LUIKOV, 1966; LUIKOV, 1975) :

$$\frac{\partial \theta}{\partial t}_F = \nabla . (a \nabla \theta_F) + \frac{\varepsilon L}{C} \frac{\partial W}{\partial t} \qquad \text{(I)}$$

$$\frac{\partial W}{\partial t} = \nabla . (a_m \nabla W) + \nabla . (a_m \delta \nabla \theta_F) \qquad \text{(II)}$$

ε représente le taux de changement de phase liquide-vapeur dans le produit; a, a_m, L, C et le coefficient de thermomigration δ dépendent du produit, de W et de θ_F.

On remarquera que, dans le cas d'un séchage intense, une zone complètement sèche ne contenant pas d'eau liquide, peut éventuellement se développer dans les couches externes du fruit.

3. — Programme expérimental de détermination des paramètres

Une modélisation globale d'un processus de séchage industriel comprend une description des trois aspects que nous avons évoqués : bilans sur l'air, à l'interface entre air et surface du produit, transferts au sein même du produit. L'ajustement d'un modèle global à des observations faites sur l'installation de séchage elle-même fournit des informations intéressantes permettant une identification in situ (BERTIN, PIERRONNE, 1976). Mais les conditions de fonctionnement d'un appareillage industriel ne permettent pas toujours une détermination fine des paramètres mis en jeu, détermination qui ne peut se faire que si les conditions du séchage sont définies avec une grande précision. C'est la raison pour laquelle, le séchage de fruits dans une étuve de laboratoire et dans des conditions de température, d'humidité et d'écoulement d'air analogues à la réalité est intéressant.

D'autre part, il convient de noter que certains paramètres intervenant dans le système complet d'équations décrivant le phénomène sont accessibles par des déterminations annexes directes.

3.1. — *Séchage en étuve de laboratoire*

Une étuve de laboratoire est intéressante, parce que, compte tenu de sa grande souplesse de fonctionnement, elle permet non seulement de simuler tel ou tel essai industriel, mais aussi d'étudier des conditions de séchage très différentes de celles ordinairement retenues.

L'étuve que nous avons utilisée est régulée en température et en humidité par tout ou rien (dans la gamme d'essais effectués la précision de régulation sur la température du thermomètre sec et sur celle du bulbe humide est de $\pm$ 1 °C). L'humidité de l'air est déduite par la méthode psychrométrique (température du bulbe humide et température sèche). Pour réaliser, autour du fruit à sécher, un écoulement d'air analogue à celui existant dans un tunnel, un carénage a été mis en place face au ventilateur de l'étuve. La vitesse moyenne de l'air autour du fruit est d'environ 4 m/s.

Toutes les températures, correspondant aux résultats, sont mesurées par des thermocouples cuivre-constantan. L'humidité de l'air est déduite par la méthode psychrométrique.

L'humidité moyenne du fruit est connue à chaque instant à partir de la perte de poids du fruit mesurée par une jauge Statham et de la teneur en eau initiale. Cette dernière est déduite de corrélations globales entre teneur en eau et indice de réfraction du jus; elle pourrait être également calculée à partir des résultats d'un séchage total à température relativement élevée du fruit ayant servi à l'essai.

3.2. — *Déterminations annexes*

Par déterminations annexes nous entendons toutes les déterminations que nous pouvons effectuer directement à partir du produit. Nous retiendrons principalement :

— la détermination des caractéristiques thermiques du fruit, conductivité et diffusivité thermiques, par refroidissement ou réchauffement (Huynh Van Nghia, 1970; Sweat, 1974),

— les courbes de sorption-désorption de l'eau dans le fruit établies par des expériences faites également en étuve (Leroy, 1975),

— les caractéristiques géométriques des fruits (forme et taille) et leur masse volumique initiale (Rotstein, Laura, de Cemborain, 1974).

3.3. — *Difficultés spécifiques aux produits étudiés*

Le modèle que nous avons décrit au § 2 est directement utilisable pour décrire le séchage de produits inertes tels que particules de charbon, matériaux de construction, etc. dans la mesure où l'évolution de chacun des coefficients en fonction de $\overline{W}$ et $\overline{\theta}_F$ a été déterminée. Son extension au cas des produits fruitiers se heurte à certaines contraintes au nombre desquelles on note :

— la variation du volume du fruit au fur et à mesure du séchage : il est souvent difficile de tenir compte de ce phénomène de retrait dans la mesure où on ne peut pas considérer que la masse volumique de la matière organique du fruit ρ_S reste constante au cours du séchage;

— l'existence de plusieurs régimes de séchage, en relation étroite avec la nature des forces de liaison entre l'eau et les autres constituants du fruit : ces régimes de séchage, mis en évidence par la forme des courbes de désorption, correspondent à des vitesses de séchage différentes pour les mêmes conditions extérieures (Keey, 1972).

4. — Équations de transfert dans le cas d'un fruit sphérique

Un grand nombre de fruits, parmi les plus courants, ont une forme telle qu'on peut les assimiler à des sphères, l'équivalence entre fruits et sphères étant faite en conservant les volumes de l'objet réel et du modèle.

4.1. — *Transferts au sein du fruit*

Dans le cas d'un produit homogène de forme sphérique, les équations générales (I) et (II) se simplifient et les fonctions W et θ_F de la seule coordonnée d'espace r satisfont alors aux équations suivantes :

$$\frac{\partial(r\,\theta_F)}{\partial t} = a\,\frac{\partial^2(r\,\theta_F)}{\partial r^2} + \frac{\varepsilon L}{C}\,\frac{\partial(rW)}{\partial t} \qquad \text{(III)}$$

$$\frac{\partial(rW)}{\partial t} = a_m\,\frac{\partial^2(rW)}{\partial r^2} + a_m\,\delta\,\frac{\partial^2(r\,\theta_F)}{\partial r^2} \qquad \text{(IV)}$$

équations dans lesquelles les paramètres ε, a, a_m, C, L et δ bien que dépendant pour certains d'entre eux de la teneur en eau du fruit, seront considérés comme constants.

4.2. — *Conditions aux limites*

Le séchage est assuré par convection forcée de l'air dont la température et l'humidité interviennent dans l'écriture des conditions aux limites, i.e. des conditions à la surface du fruit qui expriment les bilans énergétiques et massique en $r = R$ soit :

$$\lambda\,\frac{\partial\,\theta_F}{\partial r} = \alpha(\bar{\theta}_A - \theta_F) - \alpha'_m L(1 - \varepsilon)\left(d_w F(\theta_F) - f(\bar{\theta})_A)\right) \qquad \text{(V)}$$

$$a_m \rho_S\,\frac{\partial W}{\partial r} + a_m \rho_S\,\delta\,\frac{\partial\,\theta_F}{\partial r} = -\,\alpha'_m\left(d_w F(\theta_F) - f(\bar{\theta}_A)\right) \qquad \text{(VI)}$$

L'écoulement gazeux est caractérisé par sa température moyenne $\bar{\theta}_A$ et la pression partielle en eau f, liée à l'humidité H_R. La simulation numérique d'un essai en étuve est effectuée en prenant en compte comme données, les courbes d'évolution de $\bar{\theta}_A$ et H_R en fonction du temps, telles qu'elles sont mesurées en continu au cours de l'essai.

Dans les équations (V) et (VI), les coefficients de transfert de chaleur α et de masse α'_m entre fruit et air jouent un rôle essentiel : ils dépendent principalement de la vitesse d'écoulement d'air et de l'état de surface du produit. $F(\theta_F)$ est la tension de vapeur saturante correspondant à la température du fruit tandis que d_w est un coefficient qui prend en compte le phénomène de désorption.

Pour l'écriture des conditions aux limites correspondant à la partie centrale du fruit, on suppose que ce dernier a un noyau sphérique de rayon R_o ayant les mêmes propriétés thermiques que la pulpe mais de teneur en eau nulle, d'où les conditions :

$$\frac{\partial\,\theta_F}{\partial r} = 0 \quad \text{en } r = 0 \quad \forall t \qquad \text{(VII)}$$

$$\frac{\partial W}{\partial r} = 0 \quad \text{en } r \leqslant R_o \quad \forall t \qquad \text{(VIII)}$$

Au début du séchage, la température et la teneur en eau du fruit sont uniformes, ce qui correspond aux conditions initiales suivantes :

$$\theta_F = \theta_{Fi} \qquad r \in (O, R) \qquad t = 0 \qquad \text{(IX)}$$
$$W = W_i \qquad r \in (R_o, R) \qquad t = 0 \qquad \text{(X)}$$
$$W = 0 \qquad r \in (O, R_o), \qquad t = 0 \qquad \text{(XI)}$$

5. — Simulation numérique du séchage en étuve

5.1. — *Système d'équations*

En admettant que les solutions W (r) et θ_F (r) ont des formes paraboliques on peut à partir de (III) à (VIII) établir le système d'équations différentielles auquel satisfont les valeurs moyennes au sein du fruit de la température $\overline{\theta}_F$ et de la teneur en eau $\overline{W}$ qui sont les grandeurs les plus intéressantes dans la pratique (Babukha, Shraiber, 1974; Bertin, Pierronne, Combarnous, 1976). Ce système s'écrit, en supposant $\varepsilon = 0$, sous la forme :

$$\frac{d\overline{\theta}_F}{dt} = \frac{5a}{5\lambda + \alpha R}\left(\frac{3\alpha}{R}(\overline{\theta}_A - \overline{\theta}_F) + L\rho_S \frac{d\overline{W}}{dt}\right) \qquad \text{(XII)}$$

$$\frac{d\overline{W}}{dt} = -\frac{3\alpha'_m(W_S)}{\rho_S R}\left(d_w(W_S)F(\theta_{FS}) - f(\overline{\theta}_A)\right) \qquad \text{(XIII)}$$

5.2. — *Hypothèses simplificatrices*

Les coefficients ne correspondant pas à des données numériques directement accessibles sont les coefficients de transfert α et α'_m (W_S) et le coefficient $d_w(W_S)$ décrivant le phénomène de désorption.

Dans la mise en œuvre du modèle plusieurs hypothèses simplificatrices ont été adoptées :

— θ_{FS} est défini à partir de $\overline{\theta}_A$ et de $\overline{\theta}_F$ par : $\theta_{FS} = (\overline{\theta}_A + \overline{\theta}_F)/2$

— $\alpha'_m(W_S)$ est remplacé par une fonction de $\overline{W}$ (tabl. 1);

— la fonction $d_w(W_S)$, définie par les courbes de sorption-désorption (§ 3.2) est assimilée à une forme linéaire bien définie de W (tabl. 1);

— pour des raisons de commodité et en accord avec les observations faites sur les courbes de séchage, les coefficients α et α'_m ont été décrits par des fonctions dépendant respectivement du temps t et de $\overline{W}$ (tabl. 1);

— les équations (XII) et (XIII) ont été établies en ne prenant pas en compte le phénomène de retrait ce qui implique que ρ_S et R sont constants. Compte tenu des faibles vitesses de séchage il est toutefois possible d'utiliser ce système d'équations en faisant varier R, tout en supposant ρ_S constant et égal à une valeur moyenne. L'évolution de R en fonction du temps se déduit de celle de $\overline{W}$ (Pierronne, 1977; Piacentini, Combarnous, 1977). Compte tenu de l'allure des courbes de séchage qui ont été simulées dans le cadre de ce travail, R a été décrit comme une fonction de la seule variable $\overline{W}$ (Pierronne, 1977) (tabl. 2).

TABLEAU I

Valeurs numériques des paramètres utilisés dans la simulation numérique du séchage en étuve (PERRY, 1944; CAZAUBON, BERTIN, BLAZQUEZ, 1977)

$L_i = 592$ kcal/kg	$C_s = 0{,}32$ kcal/kg °C
$\rho_i = 1\,080$ kg/m³	$\rho_s = 1\,400$ kg/m³
$a = 5{,}75\ 10^{-4}$ m²/h	$\overline{R} = 13{,}5\ 10^{-3}$ m
$H_R = 0{,}1$	$\lambda = 0{,}43$ kcal/h m °C
$\overline{W}_i = 3{,}03$	$\overline{\theta}_{Fi} = 35$ °C
$\alpha_i = 204{,}4$ kcal/h m² °C	$\beta = 1{,}14\ 10^{-4}$ kg/mhPa
$\alpha'_m = \beta\left(\frac{\overline{W}}{\overline{W}_i}\right)^{\gamma}$	$\gamma = 1{,}16$ S. D.
$d_w = 1$	$\overline{W} \in (\overline{W}_i;\ 1{,}3)$
$d_w = 0{,}4\ \overline{W} + 0{,}48$	$\overline{W} \in (1{,}3;\ 0{,}3)$
$\alpha = \alpha_i$	$t \in (0;\ 1$ h)
$\alpha = \alpha_i + \nu(t - 1)$	$t \in (1$ h; 12 h)
avec $\nu = \frac{80 - \alpha_i}{11}$ kcal/h² m² °C	

TABLEAU 2

Valeurs optimales des paramètres $\widehat{\alpha}_i$, $\widehat{\beta}$, $\widehat{\gamma}$ *obtenues avec des hypothèses simplificatrices différentes sur R et* ε. *Des essais ont été effectués avec* ε *variable suivant un créneau* (2) *sans amélioration* (PIERRONNE, 1977).

R	Constant	Variable (1)	Variable (1)
ε	Nul	Nul	Variable (2)
$\widehat{\alpha}_i$ (kcal/hm² °C)	221,5	250	249
$\widehat{\beta} \times 10^4$ (kg/m² hPa)	1,14	1,5	1,5
$\widehat{\gamma}$ (S. D.)	1,14	1,34	1,34
Critère $\widehat{J}$	25,3	20,5	25,7

(1) $R(\overline{W}) = 1{,}06\ 10^{-2}(1 + 1{,}4\ \overline{W})^{1/3}$.

(2) $\varepsilon = 0 \quad t \in (0;\ 2{,}5h)$,
$\varepsilon = 1 \quad t \in (2{,}5h;\ 12h)$.

La méthode d'optimisation utilisée pour obtenir $\widehat{\alpha}_i$, $\widehat{\beta}$ et $\widehat{\gamma}$ est la méthode de Rosenbrock; les valeurs des autres paramètres sont indiquées dans le tableau 1 et le critère J est donné par :

$$J = \sum_{j=1}^{13} (\overline{\theta}^j{}_{Fex} - \overline{\theta}^j{}_{Fth})^2 + 692{,}5 \sum_{j=1}^{13} (\overline{W}^j{}_{ex} - \overline{W}^j{}_{th})^2$$

5.3. — *Résolution numérique*

Le modèle ainsi constitué a été résolu par un algorithme de Runge-Kutta-Gill d'ordre 4, les seuls paramètres à identifier étant les coefficients α_i, β, γ utilisés dans les expressions α et α'_m.

L'accord relativement bon entre courbes théoriques et points expérimentaux a été obtenu au terme d'une procédure d'optimisation. A titre d'exemple, les figures 1 et 2 présentent une comparaison entre résultats d'expériences et une simulation numérique portant respectivement sur la température du fruit $\overline{\theta}_F$ et sa teneur en eau moyenne $\overline{W}$. Les valeurs de l'ensemble des paramètres utilisés pour cette simulation sont rassemblées dans le tableau 1; les valeurs des paramètres, sur lesquels la procédure d'identification a été appliquée, présentées dans ce tableau correspondent à une optimisation à l'aide de la méthode « simplexe » de Nelder et Mead (PIERRONNE, 1977).

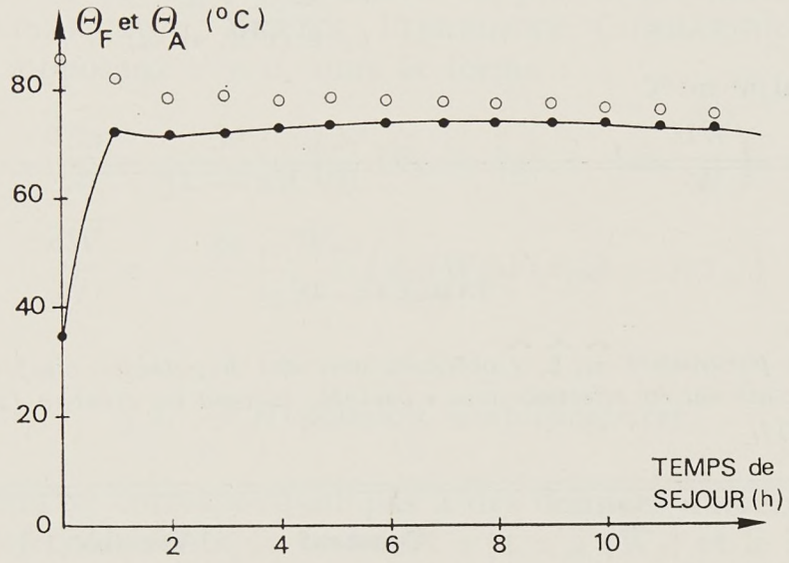


FIG. 1. — *Évolution de la température moyenne du fruit : comparaison entre résultats numériques (trait continu———) et points expérimentaux (●). Les valeurs imposées de la température moyenne de l'air θ_A sont notées par le symbole ○.*

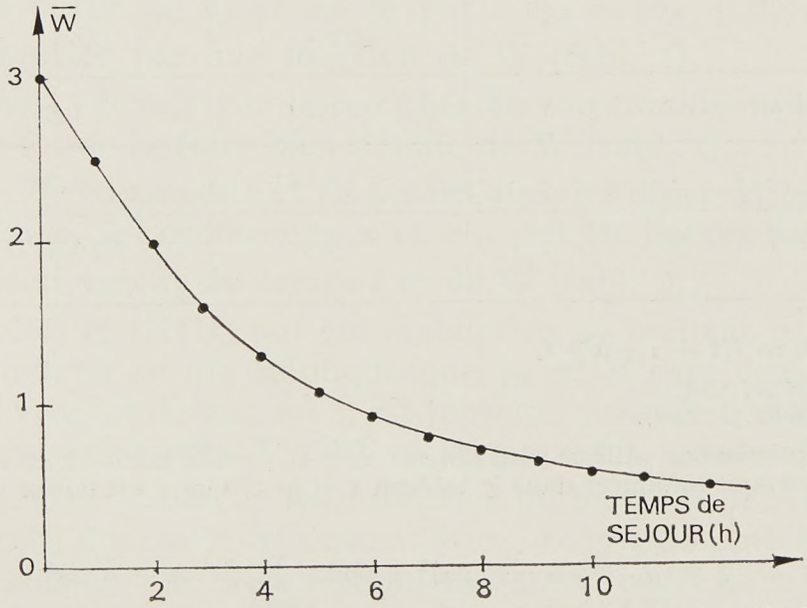


FIG. 2. — *Teneur en humidité moyenne du fruit : comparaison entre résultats numériques (trait continu ———) et points expérimentaux (●).*

TABLEAU 3

Valeurs numériques optimales des paramètres $\widehat{\alpha_i}$, $\widehat{\beta}$, $\widehat{\gamma}$ obtenus par différentes méthodes d'optimisation avec R fixe et $\varepsilon = 0$

	(1)	(2)	(3)
α_i (initial) kcal/h m² °C	100	100	50; 100; 200; 250
β (initial) $\times$ 10^4 kg/m²h Pa	1	1	0,5; 0,8; 1; 1,5
γ (initial) S.D.)	1	1	0,6; 0,9; 1; 1,5
$\widehat{\alpha_i}$ (kcal/h m² °C)	211,8	221,5	204,4
$\widehat{\beta} \times 10^4$ (kg/m²h Pa)	1,07	1,11	1,14
$\widehat{\gamma}$ (S. D.)	1,07	1,14	1,16
J (critère initial)	305,6	305,6	3966; 770; 106; 44
$\widehat{J}$	27,5	25,3	24,2
Temps d'exécution (PDP 1140) . .	3 h	2 h	1 h 15 mm

(1) Méthode « Axe par Axe », recherche de la valeur optimale de chaque paramètre suivant la direction des axes correspondant successivement à chaque paramètre (PIERRONNE, 1977).
(2) Méthode de Rosenbrock (PIERONNE, 1977).
(3) Méthode « simplexe » de NELDER et MEAD (exemples de résultats fig. 1 et 2).

Plusieurs autres méthodes d'optimisation ont été utilisées dont une comparaison est présentée dans le tableau 3.

Après l'examen de ces différentes procédures d'optimisation, une analyse de la sensibilité des résultats aux paramètres β, γ, a et α_i a été effectuée, à l'aide de critères spécifiques type moindres carrés, prenant uniquement en compte un ensemble de valeurs calculées et expérimentales de $\overline{W}$ ou de $\overline{\theta}_F$, précisant l'influence de tel ou tel paramètre sur telle ou telle évolution (par exemple, l'influence de β sur $\overline{W}$), et à l'aide d'un critère J prenant en compte la somme des deux critères spécifiques (tabl. 4). Nous constatons que le modèle est plus sensible aux paramètres β et γ; ces paramètres précisent le coefficient de transfert de masse entre fruit et air. L'influence plus faible des paramètres thermiques α_i et a s'explique par le fait que le régime transitoire, correspondant au temps de montée en température du fruit est nettement plus faible que le temps de séjour du fruit dans l'étuve.

TABLEAU 4

Influence de β, γ, α_i et a sur l'évolution de $\overline{W}$ et $\overline{\theta}_F$

	Critères spécifiques Influence sur :		Critère global
	$\overline{W}$	$\overline{\theta}_F$	
β	●	◓	●
γ	●	◓	●
α_i	○	◓	○
a	○	○	○

● forte ◓ moyenne ○ faible

On notera enfin que les valeurs optimales des paramètres obtenues sont très proches à 20 p. 100 environ, des valeurs atteintes par les mêmes procédures sur une installation de séchage réelle (BERTIN, PIERRONNE, 1976; BERTIN, PIERRONNE, COMBARNOUS, 1976). Ceci constitue une bonne justification des essais faits en étuve pour déterminer ces paramètres.

6. — Conclusion

La modélisation du séchage de produits agroalimentaires aussi délicats que les fruits fait appel à une description des transferts de chaleur et de masse à plusieurs échelles, l'installation de séchage proprement dite et le fruit lui-même, les principales difficultés dans l'estimation des paramètres se situant surtout à l'échelle du fruit.

Si certains paramètres peuvent être estimés ou mesurés directement, d'une manière indépendante de la technique de séchage appliquée, d'autres ne peuvent être appréciés que par un processus d'identification appliquée à l'installation de séchage elle-même, dans des conditions bien définies. L'étude présentée ici d'un cas précis indique une autre voie possible de détermination; si les conditions de simulation sont bien respectées, des essais en étuve plus faciles à mettre en œuvre peuvent conduire aux valeurs recherchées.

Il convient cependant de ne pas perdre de vue, que les coefficients identifiés n'ont un sens physique intrinsèque que si toutes les hypothèses simplificatrices retenues sont parfaitement fondées. Lorsque tel n'est pas exactement le cas, dans le phénomène de retrait du fruit par exemple, les valeurs obtenues intègrent l'influence d'effets secondaires non directement explicités.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble du groupe de travail sur le séchage de la prune d'Ente C.T.G.R.E.F.-I.N.R.A.-G.R.A.I. et plus particulièrement MM. Mesnier, Cazaubon, Gevers.

Notations

a	Diffusivité thermique (m^2/h).
a_m	Diffusivité massique (m^2/h).
C	Chaleur massique du fruit (kcal/kg °C).
d_w	Activité de l'eau (S.D.).
f	Pression partielle de la vapeur d'eau dans l'air (Pa).
F	Pression de vapeur saturante (Pa).
H_R	Humidité relative de l'air.
J	Critère (S. D.).
L	Chaleur latente de vaporisation (chaleur de désorption incluse) (kcal/kg).
r	Coordonnée radiale au sein du fruit (m).
R	Rayon de la sphère équivalente au fruit (m).
t	Temps (h).
W	Teneur en eau du fruit : masse d'eau rapportée à la masse de matière sèche (kg/kg).
α	Coefficient de transfert de chaleur (kcal/hm² °C).
α'_m	Coefficient de transfert de masse (kg/m²hPa).
β, γ	Coefficients définissant $\alpha'_m(W_S)$.
δ	Coefficient de thermomigration (1/°C).
ε	Taux de changement liquide-vapeur dans le fruit (S.D.).
ν	Coefficient définissant α (kcal/h²m² °C).
θ	Température (°C).
λ	Conductibilité thermique (kcal/hm °C).
ρ	Masse volumique du fruit (kg/m³).

Indices

A	Air	o	Indice du noyau (R_o).
ex	Expérimental	S	Sec, surface.
F	Fruit.	th	Théorique.
i	Initial.	—	Moyen.
m	Masse.	^	Optimal.

Summary

Determination of drying parameters for some compact fruits

As a part of a general research program developped by several scientific organizations, a model has been derived for drying of « prunes d'Ente » in tunnel drier. This paper deals with an application of the model to the analysis of the drying curves of the product in a laboratory

drying-stove. This procedure appears to be more accurate and easier to handle for the determination of the main characteristic parameters, than a direct application of the model to the tunnel-driers themselves.

The mathematical model which allows the estimate of the heat and mass transfer coefficients, includes the heat and mass balance equations inside the fruit, which is assumed to be spherical, as well as the air-fruit interface. As a simplifying procedure the model only considers average values of water content and temperature in the product, which obey at a non linear differential equations system. This system is solved by Runge-Kutta-Gill method. The parameters to identify, and particularly the heat and mass tranfer coefficients between air and fruit are derived by several optimization methods, a comparaison of which is given.

Références bibliographiques

BABUKHA C. L., SHRAIBER A. A., 1974. *Interphase heat transfer in polydisperse suspension flows*. Communications CT 2-5. Fifth international transfer conference, Tokyo. « *Heat Transfer, 1974* », **5**, 69-73. J.S.M.E.-S.C.E.J.

BERTIN R., PIERRONNE F., 1976. *Identification of fruit tunnel drier behavior*. 14th international automation and instrumentation conference. FAST-BIAS, Milan, Comptes rendus, 215-223.

BERTIN R., PIERRONNE F., COMBARNOUS M., 1976. Modélisation et simulation du séchage des fruits en tunnel. *Ind. alim. agric.*, **93** (12), 1431-1436.

CARTIER-MICHAUD R., 1976. *Étude de la déshydratation de la prune d'Ente dans les appareils de séchage continu*. Thèse C.N.A.M., mention Agriculture.

CAZAUBON C., BERTIN R., BLAZQUEZ M., 1977. *Séchage de la prune d'Ente. Étude des paramètres influençant la durée de séchage*. Note technique.

HUYNH VAN NGHIA, 1970. *Contribution à l'étude d'un dispositif de mesure de la diffusivité thermique*. Mémoire d'ingénieur des travaux ruraux.

KEEY R. B., 1972. *Drying. Principles and practice*. Pergamon Press.

KNEULE F., 1964. *Le séchage*. Eyrolles.

LEBEDEV P. D., GINZBURG A. S., 1971. *General problems of drying : theory and technique. Progress in heat and mass transfer*, vol. 4, Pergamon Press.

LEROY E., 1975. *Courbes de sorption-désorption de pruneaux*. C.T.G.R.E.F., Groupement de Bordeaux.

LUIKOV A. V., MIKHAILOV Y. A., 1965. *Theory of energy and mass transfer*. Pergamon Press.

LUIKOV A. V., 1966. *Heat and mass transfer in capillary porous bodies*. Pergamon Press.

LUIKOV A. V., 1975. System of differential equations of heat and mass transfer in capillary porous bodies. *Int. J. Heat Mass Transfer*, **18**, 1-14.

PERRY R. L., 1944. *Heat and vapor transfer in the dehydratation of prunes*. Trans. A.S.M.E., **66**, 448-456.

PIACENTINI R. C., COMBARNOUS M. 1977. Modélisation du séchage solaire de fruits. *Rev. intern. Héliotechnique*. COMPLES, 2e semestre, 44-49.

PIERRONNE F., 1977. *Modélisation et identification d'un processus de séchage*. Thèse de Troisième Cycle. Université de Bordeaux I.

ROTSTEIN E., LAURA P. A., DE CEMBORAIN M. E., 1974. Analytical prediction of drying performance in non-conventional shapes. *J. Food Sci.*, **39**, 627-631.

SWEAT V. E., 1974. Experimental values of thermal conductivity of selected fruits and vegetables. *J. Food Sci.*, **39**, 1080-1083.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 501-508.

Évolution des composés volatils soufrés au cours de la conservation de laits stérilisés U.H.T.

J.-P. DUMONT et J. ADDA

Laboratoire de Technologie Laitière,
Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas, France

Résumé

On a suivi la variation des produits volatils soufrés dans le lait stérilisé U.H.T. durant une période de conservation de 3 mois. Tandis que l'hydrogène sulfuré abondant juste après la stérilisation disparaît progressivement, les autres composés soufrés voient leur concentration rester pratiquement constante.

Les profils chromatographiques obtenus diffèrent suivant le procédé technologique utilisé. Le chauffage direct altère moins le lait que le chauffage indirect. Cependant, dans tous les cas, la dénaturation des protéines est suffisante pour permettre de distinguer aisément entre le lait stérilisé et le lait cru par l'analyse instrumentale.

Mots clés : *composés soufrés volatils, lait U.H.T., conservation aseptique, procédé de stérilisation, head space.*

I. — Introduction

Bien souvent, le lait stérilisé U.H.T. est présenté comme un produit qui allie les possibilités de conservation du lait stérilisé classique à la qualité organoleptique du lait frais pasteurisé. En réalité, si la commercialisation de cette catégorie de lait présente des avantages évidents pour l'industriel et le distributeur, l'argumentation portant sur le maintien de la qualité organoleptique apparaît plus contestable.

Il a été démontré depuis longtemps que le chauffage du lait entraîne la formation de composés carbonylés tels le diacétyle (SCANLAN *et al.*, 1968), et la dénaturation de certaines protéines ce qui se traduit par la libération presque quantitative des groupes-SH (LYSTER, 1964), précurseurs de corps volatils soufrés. Les composés soufrés ont souvent été associés avec le goût de cuit qui apparaît dans

certains laits chauffés (WATANABE, 1975), mais, présents à faible concentration dans le lait, leur dosage à l'aide des méthodes colorimétriques classiques était assez difficile et peu spécifique.

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse avec détection spécifique du soufre par photométrie de flamme a rendu possible le dosage de composés soufrés présents à l'état de traces. Adaptant au lait la méthode d'injection directe d'un échantillon gazeux mise au point par QVIST et von SYDOW (1976), nous avons pu étudier les effets respectifs de deux procédés de stérilisation U.H.T. et l'évolution des composés soufrés au cours de la conservation.

Matériel et méthodes

2.1. — *Échantillonnage*

2.1.1. *Étude du facteur technologique et de l'évolution au cours de la conservation.*

Les échantillons prélevés directement à l'usine provenaient de deux fabrications réalisées en parallèle avec le même lait cru de départ. Ils étaient de deux types différents :

Le premier lot était constitué de lait homogénéisé standardisé à 34 g de M.G./l et stérilisé dans un échangeur tubulaire (procédé STORK).

Le second lot était composé de lait homogénéisé, standardisé à 17 g de M.G./l et stérilisé par injection de vapeur, puis détente (procédé de l'upérisation).

Nous disposions en outre d'un échantillon de lait cru prélevé avant standardisation.

Tous les échantillons, conditionnés en briques cartonnées de un litre remplies sous vide d'air, ont été prélevés en une seule fois en bout de chaîne.

Les échantillons ont été conservés à l'abri du soleil à température extérieure ambiante ce qui correspond à des conditions de conservation rencontrées pratiquement.

A l'exception de la première semaine où des contrôles ont été réalisés 2 et 3 jours après la fabrication, les analyses ont été effectuées à des intervalles de 7 jours pendant 3 mois.

2.1.2. *Laits de commerce.*

Nous avons acheté au hasard dans le commerce de détail un certain nombre d'échantillons représentant une gamme assez complète des différents types de lait-boisson. Ces laits ont été analysés le jour même de leur achat.

2.2. — *Récupération des produits volatils*

Une prise d'essai de 100 ml est transférée dès l'ouverture de l'emballage dans une fiole de verre préalablement refroidie dans la glace. Immédiatement refermée, la fiole est replacée dans la glace pour amener l'échantillon à une température voisine de 0 °C, puis purgée par de l'hydrogène. Il est en effet nécessaire d'éliminer

au maximum l'oxygène car il présente le double inconvénient de réagir sur les composés réducteurs (H_2S, CH_3SH) et de se condenser dans le piège refroidi par de l'azote liquide. Après équilibrage à 30 °C pendant 30 min, 500 ml de l'atmosphère gazeuse de la fiole sont injectés suivant la technique de Qvist et von Sydow (1976) en utilisant un système entièrement réalisé en verre et téflon.

On a utilisé un chromatographe Girdel 3000 équipé d'un détecteur à photomètre de flamme Tracor modifié de façon à ce que l'extrémité de la colonne en verre vienne au contact du brûleur. On évite ainsi tout contact entre effluent et

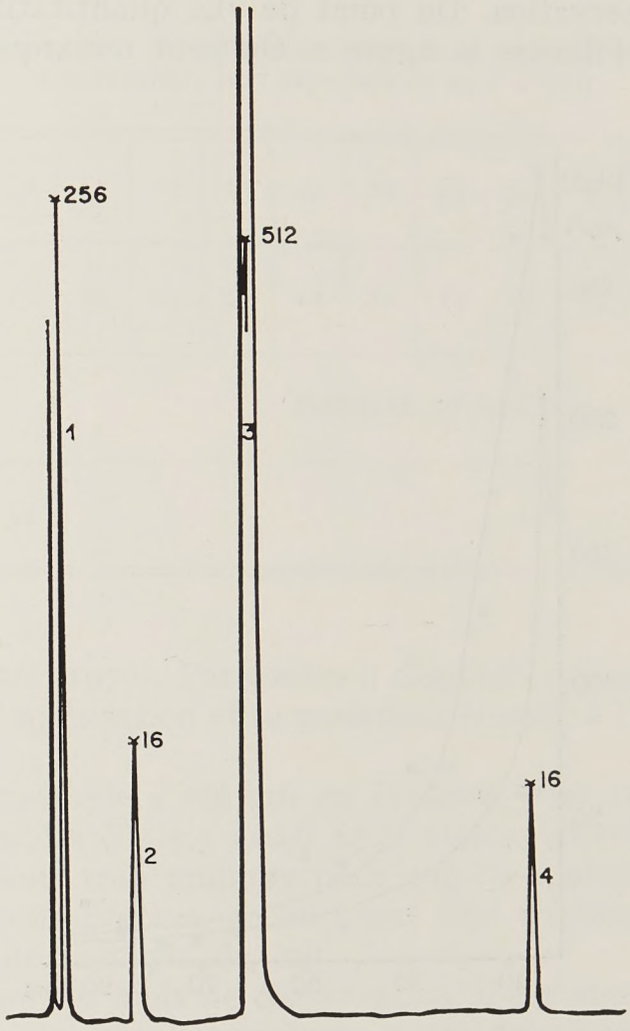


Fig. 1. — *Chromatogramme obtenu à partir d'un lait stérilisé (échantillon n° 11)*

1. Hydrogène sulfuré.
2. Méthanethiol.
3. Sulfure de méthyle.
4. Disulfure de méthyle.

surface métallique. La colonne (6,40 m, 2 mm d.i.), remplie par du Chromosorb G. AW. DMCS (80/100 mesh) imprégné de 5 p. 100 d'Igepal CO 630 a été préparée selon la technique de Jensen, Stratinger et Westra (1971). La température du four a été maintenue à 10 °C pendant 15 min, puis programmée à raison de 4° C /min jusqu'à 110 °C. Le chromatogramme présenté à la figure 1 donne un exemple de la séparation obtenue.

Les composés sont identifiés d'après leur temps de rétention relatif en utilisant le disulfure de méthyle comme référence.

La concentration des différents composés dans chaque échantillon est calculée à partir de courbes étalons établies en analysant des laits dans lesquels les produits

soufrés avaient été ajoutés en quantités exactement connues. Il a été possible de vérifier que pour chacun des produits et dans le domaine considéré, la réponse du détecteur variait de façon linéaire avec le carré de la concentration.

Résultats

L'hydrogène sulfuré a été identifié dans tous les échantillons analysés au cours de la période de conservation. Du point de vue quantitatif, les variations sont considérables comme l'illustre la figure 2. On peut remarquer en particulier que

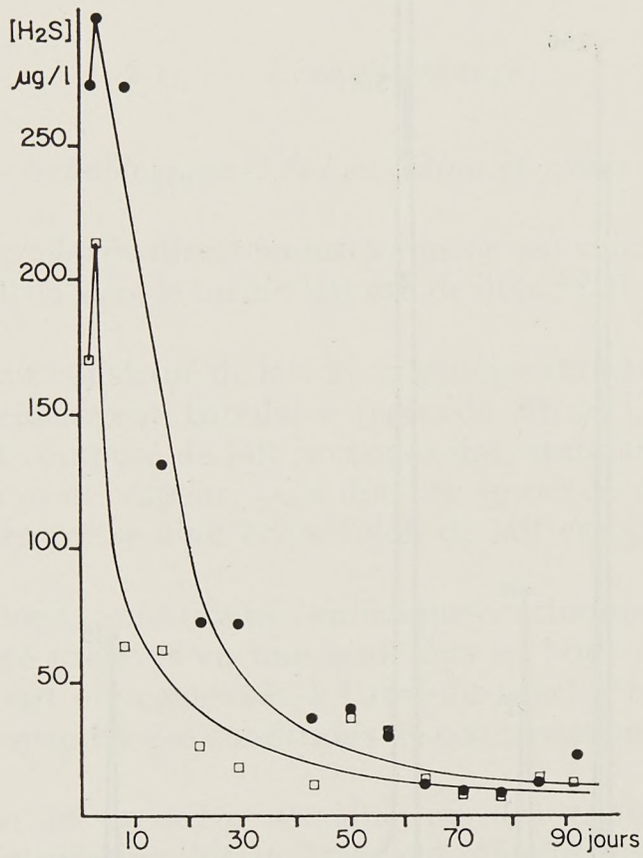


FIG. 2. — *Évolution de la teneur en H_2S au cours de la conservation du lait*
Les résultats sont exprimés en µg/l de lait

Procédé Stork ●—●
Procédé de l'upérisation □—□

l'hydrogène sulfuré est très abondant durant les 3 premiers jours qui suivent la stérilisation U.H.T. puis qu'il diminue rapidement durant le premier mois de stockage. Ensuite la baisse de la teneur en H_2S continue à un rythme régulier mais plus lent jusqu'à atteindre au bout de 2 à 3 mois la valeur rencontrée dans le lait cru d'origine.

On notera que l'évolution a été identique dans lesdeux séries d'échantillons mais qu'en valeur absolue la quantité d'H_2S présente dans le lait dépend de la technique de stérilisation utilisée.

Il n'y avait pas de méthanethiol dans le lait cru. Par contre les deux tiers des échantillons de lait U.H.T. en contenaient des traces ($<$ 1 µg/l). Les quantités

mises en évidence sont à la limite de la sensibilité de la méthode, ce qui interdit de dégager une corrélation entre la production du méthanethiol et la technologie utilisée.

Déjà naturellement présent dans le lait cru (PATTON, FORSS et DAY, 1956), le sulfure de méthyle est peu affecté par la stérilisation selon le procédé STORK et sa concentration dans le lait reste sensiblement constante tout au long de la période de conservation (tabl. 1), observation qui confirme les résultats de JEON,

TABLEAU 1

Teneurs en sulfure de méthyle au cours de la conservation du lait
Les résultats sont exprimés en µg/l de lait

Nombre de jours	2	3	8	15	22	29	43	51	57	64	71	78	85	92
Stork	13	16	15	11	11	11	13	15	15	11	12	11	13	12
U.P.	Inférieur ou égal à 0,3													
Lait cru	32													

THOMAS et REINECCIUS (1976). Par contre il disparaît presque complètement lors de la stérilisation par upérisation et se maintient ensuite à l'état de traces durant le stockage.

Le disulfure de méthyle a été mis en évidence dans tous les échantillons à des concentrations faibles (de 0,3 à 0,6 µg/l) mais relativement constantes. Les variations mesurées sont trop minimes pour que l'on puisse attribuer à l'un des facteurs (temps de conservation, technologie) une quelconque influence sur la teneur en disulfure de méthyle du lait.

Au bout d'environ un mois de conservation, il est apparu un composé nouveau dont le temps de rétention est analogue à celui du sulfure de carbone. Malheureusement, les quantités de substances disponibles étaient beaucoup trop faibles pour que l'on puisse utiliser le couplage C.PG-SM et permettre ainsi la confirmation définitive de l'identité du composé.

Enfin nous présentons au tableau 2 le résultat d'analyses effectuées sur des laits achetés dans le commerce. Ces échantillons appartiennent aux différentes catégories de lait boisson habituellement proposées aux consommateurs. On peut constater que les laits stérilisés sont particulièrement riches en composés volatils ce qui traduit une altération importante de la fraction protéique durant le chauffage.

Les laits U.H.T. étaient vraisemblablement âgés d'un mois environ lorsque les analyses ont été effectuées. Il apparaît si l'on se réfère aux résultats exposés précédemment pour le sulfure de méthyle qu'ils ont probablement été stérilisés par le procédé d'upérisation.

Les laits pasteurisés (à l'exception du n° 8 dont le profil se rapproche plus de celui d'un lait U.H.T. que d'un lait pasteurisé) semblent, à première vue, renfermer plus d'hydrogène sulfuré que les laits U.H.T. En réalité, il faut rappeler que

TABLEAU 2

Teneurs en composés soufrés de quelques laits du commerce
Les résultats sont exprimés en µg/l de lait

Échantillon n° :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H_2S	11	375	—	34	47	11	28	15	25	23	155	167
CH_3SH	—	9	—	—	—	—	—		tr	—	6	1,5
CH_3-S-CH_3.	2,5	1	2,5	3,5	5	5	7	0,5	0,3	0,3	65	50
Disulfure de méthyle	0,3	0,5	0,3	0,3	<0,3	0,3	0,3	<0,3	0,8	1,5	3	6

Échantillon n° 1 : Lait cru.
2 : Échantillon n° 1 après ébullition.
3 : Lait pasteurisé de haute qualité.
4 : Lait entier pasteurisé. Emballage carton.
5 : Lait entier pasteurisé. Emballage plastique (même marque que 4).
6 : Lait entier pasteurisé. Emballage carton.
7 : Lait entier pasteurisé. Emballage plastique (même marque que 6).
8 : Lait entier pasteurisé. Emballage carton.
9 : Lait entier stérilisé U.H.T. Emballage carton.
10 : Lait 1/2 écrémé stérilisé U.H.T. Emballage carton.
11 : Lait entier stérilisé. Emballage carton.
12 : Lait 1/2 écrémé stérilisé. Emballage plastique.

les laits pasteurisés ont été analysés 48 h après la fabrication. La comparaison avec les résultats obtenus sur des laits U.H.T. 2 jours après la fabrication démontre que la production d'H_2S est en fait beaucoup plus importante dans les laits U.H.T.

Le lait pasteurisé de haute qualité (pasteurisation 72°, 15 s) ne contient que peu ou pas d'H_2S; ceci est en accord avec les résultats de THOMAS *et al.* (1976) et de KHAYAT (1977) selon lesquels il n'y a pas de production d'H_2S à 70 °C quelle que soit la durée du chauffage. Enfin, la comparaison des profils d'un lait avant et après ébullition met en évidence la formation d'H_2S et de méthanethiol et la disparition d'une partie du sulfure de méthyle vraisemblablement entraîné avec les vapeurs.

Discussion et conclusion

La première conclusion que l'on peut tirer de ces résultats est qu'il est possible de différencier les deux procédés de stérilisation U.H.T. à partir des profils obtenus pour les produits soufrés. Étant donné les seuils de perception extrêmement bas de ces composés, il suffit parfois d'une faible variation en valeur absolue de leur quantité pour créer un déséquilibre dans l'arôme. Dans ces conditions, l'upérisation semble une technique plus séduisante que le procédé STORK puisque les composés volatils formés durant le chauffage sont partiellement éliminés lors de la détente

sous vide et que de plus, d'après ZADOW (1969), le chauffage direct du lait conduirait à une moindre dénaturation des protéines solubles que le chauffage direct.

Lorsque l'on considère l'évolution des produits volatils au cours de la conservation, on est amené à s'intéresser principalement à H_2S et au sulfure de méthyle.

Quoique produit à partir de différentes protéines du lait durant le chauffage (HARPER et PEREIRA, 1970), l'hydrogène sulfuré semble surtout provenir de la dénaturation de la β-lactoglobuline (WATANABE, 1975).

Il est remarquable que le lait upérisé contienne encore de grandes quantités d'H_2S après la fabrication alors que le sulfure de méthyle, composé pourtant moins volatil, a été pratiquement éliminé. Comme il semble difficile d'attribuer cette différence de comportement uniquement au fait que l'hydrogène sulfuré est plus soluble dans l'eau que le sulfure de méthyle et que, d'autre part, la concentration en H_2S semble croître au début du stockage, on peut penser que ce composé est, pour une partie, retenu par la fraction protéique et qu'il n'est solubilisé que progressivement dans la phase aqueuse après le conditionnement.

La diminution d'H_2S tout au long de la conservation peut éventuellement s'expliquer par une réaction avec l'oxygène mais alors 2 objections surgissent :

— les laits stérilisés ont été conditionnés sous vide d'air;
— le chauffage indirect est réputé assurer une désoxygénation totale du lait (VEISSEYRE, 1975).

On est donc amené à penser qu'H_2S se combine avec certaines substances contenues dans le lait. On sait en effet que l'hydrogène sulfuré est capable de se combiner à température ambiante avec les aldéhydes saturés (BOELENS *et al.*, 1974) ou non (BADINGS *et al.*, 1975) pour donner des composés dont le seuil de perception est très bas. Cette supposition est d'autant plus plausible que KIRK, HEDRICK et STINE (1968) ont montré que le lait U.H.T. fraîchement stérilisé contenait des aldéhydes aliphatiques et que leur concentration augmentait au cours de la conservation (éthanal et propanal en particulier).

Enfin, on peut remarquer que le classement des laits du commerce, en fonction croissante de leur concentration en H_2S, correspond exactement à celui établi par BROWN, AURAND et ROBERTS (1961) en fonction de l'importance de la dénaturation des protéines solubles.

Comme pouvaient le laisser prévoir certaines observations (HUGUES, 1964), le traitement thermique utilisé dans la stérilisation U.H.T. n'est pas, contrairement à la stérilisation classique, assez sévère pour conduire à la formation de sulfure de méthyle. Présent naturellement dans le lait cru, ce composé a servi de témoin et il a permis ainsi de mettre en évidence la différence d'influence des deux technologies utilisées.

Le méthanethiol et son dérivé par oxydation, le disulfure de méthyle, n'existent en quantités véritablement appréciables que dans les laits les plus maltraités thermiquement (laits stérilisés et lait bouilli). Dans ces conditions, le dosage de ces composés se révèle un indicateur de la dénaturation des protéines beaucoup moins sensible que la mesure d'H_2S.

En conclusion, il apparaît que tout traitement thermique, sauf peut-être la pasteurisation à 72 °C du lait de haute qualité, conduit à la formation de composés volatils soufrés qui modifient le profil du lait cru d'origine.

Quoique beaucoup moins brutale que la stérilisation classique, la stérilisation U.H.T. entraîne déjà une dénaturation perceptible du lait.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Summary

Changes in volatile sulfur compounds in ultra-high temperature processed milks during aseptic storage

Volatile sulfur compounds were determined in U.H.T. milk every week over a 3 months storage period. Whilst methanethiol, dimethylsulfide, dimethyl disulfide had remained unaffected, hydrogen sulfide had shown a steady decrease.

GC profiles can be related with technological process. Direct heating by steam injection provides milk of higher quality than indirect heating in tubular heat exchanger (Stork process). However in both cases, heating induces sufficient changes in milk to enable the descrimination between U.H.T. milk and raw milk by mean of G.C. analysis.

Références bibliographiques

BADINGS H. T., POL J. J. C. VAN DER, 1965. Spectrophotometric determination of microquantities of hydrogen sulfide after conversion into methylene blue. *Neth. Milk Dairy J.*, **19**, 293-297.

BADINGS H. T., MAARSE H., KLEIPOOL R. J. C., TAS A. C., NEETER R., ten NOEVER de BRAUW M. C., 1976. Formation of odorous compounds from hydrogen sulfide and 2-butenal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **161**, 53-59.

BOELENS M., LINDE L. M. VAN DER, VALOIS P. J. de, DORT H. M. VAN, TAKKEN H. J., 1974. Organic sulfur compounds from fatty aldehydes, hydrogen sulfide, thiols and ammonia as flavor constituents. *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 1071-1076.

BROWN J. W., AURAND L. W., ROBERTS W. M., 1961. The influence of different methods of heating on the electrophoretic pattern of whey proteins. *Fd. Technol. Champaign.*, **15**, 480-482.

HARPER W. J., PEREIRA R. R., 1970. Mechanisms involved in heat-induced release of 35S hydrogen sulfide from milk. *XVIII International Dairy Congress*, **1E**, 59.

HUGHES R. B., 1964. Chemical studies on the herring (Clupea harengus) 9. Preliminary gas-chromatographic study of volatile sulfur compounds produced during cooking of herring. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 290-292.

JEON I. J., THOMAS E. L., REINECCTIUS G. A., 1976. Production of volatile flavor compounds in ultra high temperature processed milk during aseptic storage. Abstracts of paper, *American Chemical Society*, **172**, AGFD, 157 (*In: Dairy Sci. Abst.*, **39**, n° 1664).

JENSEN H. E., STRATING J., WESTRA W. M., 1971. The gas chromatographic determination of hydrogen sulfide and alkane thiols in beer. *J. Inst. Brew.*, **77**, 154-159.

KHAYAT A., 1977. Hydrogen sulfide production by heating tuna meat. *J. Food Sci.*, **42**, 601-609.

KIRK J. R., HEDRICK T. I., STINE C. M., 1968. Gas-chromatographic study of the flavor deterioration in high temperature — short time fluid sterile milk. *J. Dairy Sci.*, **51**, 492-497.

LYSTER R. L. J., 1964. The free and masked sulphydryl groups of heated milk and milk powder and a new method for their determination. *J. Dairy Res.*, **31**, 41-51.

PATTON S., FORSS D. A., DAY E. A., 1956. Methylsulfide and the flavor of milk. *J. dairy Sci.*, **39**, 1469-1470.

QVIST I. H., von SYDOW E. C., 1976. Unconventional proteins as aroma precursors. Chemical analysis of the volatile compounds in inheated and heated rapeseed protein model system. *J. Agr. Food Chem.*, **24**, 437-442.

SCANLAN R. A., LINDSAY R. C., LIBBEY L. M., DAY E. A., 1968. Heat-induced volatile compounds in milk. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1001-1007.

THOMAS E. L., REINECCIUS G. A., WAARD G. J. de, SLINKARD M. S., 1976. Determination of hydrogen sulfide in heated milks by gas-liquid chromatographic headspace analysis. *J. Dairy Sci.*, **59**, 1865-1869.

VEISSEYRE R., 1975. Technologie du lait, p. 256. 3e édition, *La Maison Rustique*. Paris.

WATANABE K., 1975. (*Communication personnelle.*) Cercle International des Chercheurs Laitiers, Shinfield.

ZADOW J. G., 1969. Studies on the ultra-heat treatment of milk. Part 1. Comparison of direct and indirect heating of whole milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, **24**, 44-49.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 509-531.

Étude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées

II. — Décontamination bactérienne

F. SAUZE et M. GERVAIS*

Station d'Œnologie et de Technologie Végétale, I.N.R.A., boulevard de-Gaulle, 11104 Narbonne

* *Bureau central d'Études pour les Équipements d'Outre-Mer (BCEOM)*

Résumé

Pour compléter l'étude de la vitesse de dégradation des charges contenues dans les eaux résiduaires urbaines soumises au lagunage, dont la première partie concernant la dégradation des charges organiques a été publiée antérieurement, des mesures de décontamination bactérienne ont été effectuées dans les lagunes déjà utilisées.

L'ajustement des résultats à des modèles cinétiques proposés par divers auteurs, et applicables aux bactéries de contamination fécales, a été comme précédemment recherché et établi, tant dans le cas du lagunage complet que dans celui du lagunage tertiaire.

Des formules et graphiques adaptés aux conditions climatiques locales ont été également tirés des données recueillies pour le calcul des paramètres de base utiles à l'établissement des lagunes, en fonction de la température ou de l'énergie lumineuse reçue.

Mots clés : *eaux polluées, charge bactérienne, décontamination.*

I. — Introduction

Bien que constituant l'un des paramètres qui devraient être essentiels dans l'étude du rendement des traitements épuratoires appliqués aux eaux résiduaires domestiques, la décontamination microbienne des effluents a fait souvent l'objet de recherches moins approfondies que l'élimination de la charge organique ou minérale.

En ce qui concerne plus spécialement le lagunage, quelques auteurs parmi lesquels HERMAN et GLOYNA (1958), ECKENFELDER (1961) aux USA, MARAIS et SHAW (1961) en Union Sud-Africaine, WALKER et LECLERC (1973, 1974, 1977)

en France, ont poussé assez loin l'analyse des processus d'épuration bactérienne, tout au moins en se référant au critère classique du nombre de germes-test fécaux. L'étude de la destruction d'autres germes pathogènes pour l'homme a été moins approfondie, toutefois celle des virus humains a retenu l'attention de chercheurs relativement nombreux à l'étranger.

Les remarques faites en introduction de la première partie, relatant nos recherches en épuration de matière organique (SAUZE, 1976), sont donc plus valables encore en matière de décontamination microbienne, en particulier la nécessité de vérifier la validité des théories et des techniques élaborées par les auteurs étrangers précédemment cités et éventuellement de les adapter aux conditions où se situent les installations de lagunage existantes ou prévues dans nos régions. Cet objectif nécessite des investigations *in situ*, à l'aide de bassins en vraie grandeur et non uniquement d'essais de laboratoire comme ce fut généralement le cas antérieurement.

De même nous ne rappellerons pas les objectifs généraux poursuivis en effectuant des campagnes de mesure et d'observation sur l'ensemble des bassins du littoral languedocien. Ils sont les mêmes pour l'étude de bactériologie que pour le travail précédent, et la réalisation des deux types d'expériences s'est effectuée à peu près parallèlement et simultanément.

Le but plus particulier est ici, en premier lieu, l'évaluation des taux de décontamination des bactéries-test fécales par le lagunage puisque ce critère est habituellement retenu dans les études de fonctionnement et parfois dans les contrôles de qualité d'effluents.

Des travaux antérieurs (SAUZE, 1970) sur l'effluent des bassins du Grau du Roi avaient permis une première détermination approchée de ces taux, mais les valeurs trouvées ne pouvaient être rapportées à des durées de séjour précises du fait des difficultés rencontrées pour mesurer exactement les débits d'entrée et de sortie.

En outre il s'agissait de comparer les taux de décontamination observés à des modèles mathématiques conçus pour traduire le mieux possible l'allure des variations du taux avec les paramètres les plus caractéristiques des conditions de fonctionnement : durée de séjour du milieu liquide dans les bassins et température du milieu.

Le modèle de MARAIS et SHAW, devenu d'application la plus courante et homologue de celui qui sert à évaluer la dégradation des substances organiques, était à tester en priorité. Il traduit la décroissance de la concentration en polluant, représenté en l'occurrence par les germes microbiens, et résulte de la transformation de l'équation classique du premier ordre, de forme exponentielle.

$$\frac{N}{N_0} = e^{-Kt} \qquad (1)$$

en une formule hyperbolique :

$$\frac{N}{N_0} = \frac{1}{1 + Kt} \qquad (2)$$

$\frac{N}{N_0}$ est le taux de survie, rapport entre nombre de germes /100 ml au temps de séjour t dans les bassins et le nombre de germes au temps zéro, c'est-à-dire dans l'effluent avant traitement.

La nouvelle relation est obtenue en admettant certaines hypothèses, dont la

principale est le mélange total et instantané du liquide se déversant dans un bassin avec le milieu qui y séjourne. Cette hypothèse peut s'éloigner de la réalité dans certains types d'installations ou certaines conditions de fonctionnement. Nous ne pouvons donc admettre ce modèle comme universel et ne devons pas l'adopter sans contrôle de validité ni comparaison avec d'autres modèles; il doit être en particulier confronté avec la loi exponentielle (1) ou avec des modèles pouvant en dériver.

Par ailleurs il est souhaitable, comme dans le cas des matières organiques ou minérales, de distinguer le traitement d'effluents bruts de celui d'effluents secondaires, même si leurs caractéristiques bactériologiques sont *a priori* assez voisines. En effet des interférences ont été observées par plusieurs auteurs (DAVIS et GLOYNA, 1958; OSWALD et GOTAAS, 1965; PARHAD et RAO, 1974) entre la croissance bactérienne et celle d'autres organismes, dont les principaux sont les algues vertes. Ceci entraîne des différences importantes entre les écosystèmes constitués par un effluent en traitement tertiaire, faiblement concentré en matières organiques et en phytoplancton, et un effluent n'ayant encore subi aucune épuration. Il est donc utile d'effectuer parallèlement ces investigations dans les deux types de traitement par lagunage : complet, en bassins dits de stabilisation, et tertiaire, en bassin de finition ou maturation.

La destruction d'agents pathogènes autres que les bactéries-test ne pouvait faire l'objet d'essais aussi développés que dans le cas de ces dernières, les moyens dont nous disposions ne permettant pas une évaluation véritable des rendements. Les mesures ont néanmoins visé à mettre en évidence l'importance de l'élimination, même non chiffrée, des espèces bactériennes les plus nocives, dont certaines ont fait l'objet d'études homologues *in vitro* (COETZEE et FOURIE, 1965; DAVIS et GLOYNA, 1972; WALKER *et al.*, 1977).

Néanmoins la formulation d'une cinétique de destruction des germes fécaux peut suffire pour l'objectif final des recherches, qui est d'élaborer les méthodes nécessaires au calcul des durées de séjour dans les lagunes pour l'obtention d'un taux de décontamination prédéterminé.

Comme dans le cas de la dégradation des matières organiques et minérales, le critère de décontamination bactérienne doit permettre d'effectuer ce calcul dans des conditions climatiques différentes de celles des expériences, le paramètre principal étant la température de réaction. C'est pourquoi les mêmes analyses mathématiques de données expérimentales ont été tentées en vue de déterminer la loi de variation de la constante cinétique avec la température, voire avec la quantité d'énergie reçue.

Sont exclues des recherches, compte tenu des moyens disponibles, les influences d'autres paramètres extérieurs au milieu et celle de l'écologie interne, en particulier les intéractions des germes fécaux avec les sédiments et avec les autres organismes présents dans le liquide : phyto et zooplancton, autres bactéries, bactériophages, qui devront faire l'objet de travaux ultérieurs.

II. — Méthodes et matériel

Les caractéristiques essentielles des installations utilisées ainsi que le protocole général des essais ont été décrits en tête de la première partie (SAUZE, 1976). Nous donnons ci-après un bref rappel de ce protocole général, préalablement à celui de l'étude d'épuration bactérienne.

II.1. — *Campagne d'essais — Conditions* in situ

Les méthodes et l'appareillage ont été dans l'ensemble identiques pour les essais menés dans les trois stations : celles du Grau du Roi, de Marseillan et de Leucate.

La campagne s'est effectuée en opérant sur les stations du Grau du Roi et de Leucate, dont les caractéristiques techniques essentielles ont été indiquées dans la première partie. Le lecteur y trouvera également les concentrations moyennes des effluents admis dans ces stations, du point de vue de la charge organique ainsi que la cinétique de réduction de cette charge au cours du traitement.

L'installation de Marseillan, où nous avions effectué une première expérience en 1972, consiste en une série de deux bassins de finition, dits encore de lagunage tertiaire, d'une surface de 6 000 m². Ces bassins recevaient l'effluent d'une station à boues activées. Située en bordure de l'étang de Thau, la station se trouve dans des conditions climatiques très voisines de celles du Grau du Roi. En raison de l'importance en volume de l'effluent admis, qui correspondait à 6 000 équivalents-habitants, la durée de séjour n'était que de 35 jours au cours de l'expérience.

Nous rappelons ici le protocole des prélèvements d'eau, qui s'est déroulé de façon identique à celui utilisé dans les essais sur la dégradation organique.

Au Grau du Roi, les prélèvements ont été effectués en moyenne tous les quinze jours dans l'effluent brut arrivant dans le premier bassin et après passage dans les divers bassins.

L'effluent brut, dont la composition subit parfois des variations journalières importantes, a fait l'objet de prélèvements pendant 24 h (échantillonneur continu du S.R.A.E., de fabrication artisanale), et constitution de 6 échantillons moyens de 4 h, les prélèvements sur le liquide pendant et après lagunage étant seulement instantanés.

Après passage dans les bassins, un seul échantillon était prélevé à chaque séance, effectuée à heure fixe, des mesures préliminaires ayant montré que les concentrations en germes étaient suffisamment constantes. Seules ont été d'ailleurs prises en compte des moyennes portant sur les résultats de l'ensemble des prélèvements effectués durant des périodes saisonnières ou durant le cycle complet, comme il sera précisé ci-dessous.

Le protocole adopté dans les essais de Leucate, en lagunage tertiaire ainsi qu'à Marseillan, est identique au précédent, hormis la fréquence des prélèvements qui était hebdomadaire.

Les délais séparant le prélèvement et les analyses ont été inférieurs à une heure pour les essais au Grau du Roi, à 2 h pour les essais à Leucate. Les échantillons étaient conservés en glacière durant le transport.

II.2. — *Analyses et mesures*

Les dénombrements de bactéries-test d'origine fécale ont été effectués sur les échantillons bruts, non décantés ni filtrés. On a utilisé pour ces analyses les méthodes prescrites dans la circulaire du 10 janvier 1969 « Eaux superficielles » et qui ont fait l'objet des normes AFNOR : V08-012 (Coliformes et *E. Coli*) et V08-013 (Salmonelles). Les germes ont été dénombrés selon la technique du nombre le plus probable.

Les autres bactéries pathogènes ont été identifiées à l'aide des méthodes décrites par BUTTIAUX (1958) : dilution et incorporation dans un milieu gélosé solide, croissance à température et durée d'incubation spécifiques de chaque germe.

Les mesures de température et de pH ont été effectuées *in situ* dans l'eau des bassins, à la verticale des points de prélèvements et à une profondeur de 0,30 m.

Ces travaux ont été réalisés avec le concours de l'Institut BOUISSON BERTRAND de Montpellier et du Laboratoire Municipal de Nîmes.

II.3. — *Classements et traitement des données*

Comme dans l'étude des matières organiques, les résultats d'analyses et les valeurs des températures et temps de séjour dans les bassins ont été groupés de façon à obtenir des moyennes par périodes saisonnières. La division en périodes est choisie de telle sorte qu'à l'intérieur de chacune d'elles les valeurs prises par les différents paramètres soient aussi homogènes que possible.

Les concentrations moyennes relatives à chaque période ont été établies tout d'abord à l'aide des moyennes arithmétiques des résultats des mesures. Certains résultats constituant des écarts trop importants pour donner une moyenne représentative, il a été jugé ensuite préférable de calculer les moyennes géométriques, qui amortissent mieux les écarts. On élimine ainsi l'influence de certaines surcharges accidentelles et de faible durée.

Pour chaque période, dont la durée varie de 3 à 6 mois suivant les cas, le nombre d'échantillons analysés et ayant servi de base aux moyennes est de 8 à 20 dans le cas des prélèvements d'effluent en cours de traitement, et 6 fois plus élevé dans le cas des prélèvements d'effluent brut effectués 6 fois par 24 h.

L'ajustement des données aux modèles cinétiques précédemment évoqués a été établi par approches, en recherchant des valeurs de K donnant les meilleures corrélations entre le taux de survivance N/N_0 (rapport entre les concentrations au bout de la durée de traitement t et avant traitement) et le même taux calculé à partir du modèle.

Les modèles de la fonction $K = f(T)$ ont été établis graphiquement à partir des valeurs de K résultant des calculs précédents et des températures moyennes relevées aux différentes époques de la campagne.

III. — Résultats

III.1. — *Performances des stations en décontamination bactérienne*

Pour plus de clarté, nous donnerons successivement deux groupes de résultats correspondant respectivement au lagunage complet et au lagunage tertiaire, leur confrontation étant réservée à la partie discussion.

III.11. *Lagunage complet*

III.111. *Efficacité et lois de décontamination*

Le pH des effluents a été en moyenne, au cours du cycle de fonctionnement : effluent entrant 7,5, effluent sortant 9.

TABLEAU I

*Rendement d'épuration bactérienne (Grau du Roi) — Décontamination d'*Escherichia coli, *constantes cinétiques*

Période	Température moyenne °C	Durée séjour moyenne R (jours)	Nombre d'*E. Coli* (MPN)				Taux de décontamination global		K	*k*
			Point 1b N_0	Point 3b 1er bassin N1	Point 4b 2e bassin N2	Point 5b 3e bassin N3	p. cent	log N_0/N_3		
Estivale (mai-octobre)	18	30	$2{,}36 . 10^7$	$1{,}98 . 10^5$	$2{,}65 . 10^4$	25	99,999	8,25	5	0,43
Hivernale (novembre-avril)	8	75	$8{,}8 . 10^6$	$8{,}3 . 10^6$	$8{,}3 . 10^5$	90	99,998	6,04	1,5	0,15

Coefficients cinétiques : K, selon modèle cinétique de MARAIS,
k, selon modèle exponentiel classique.

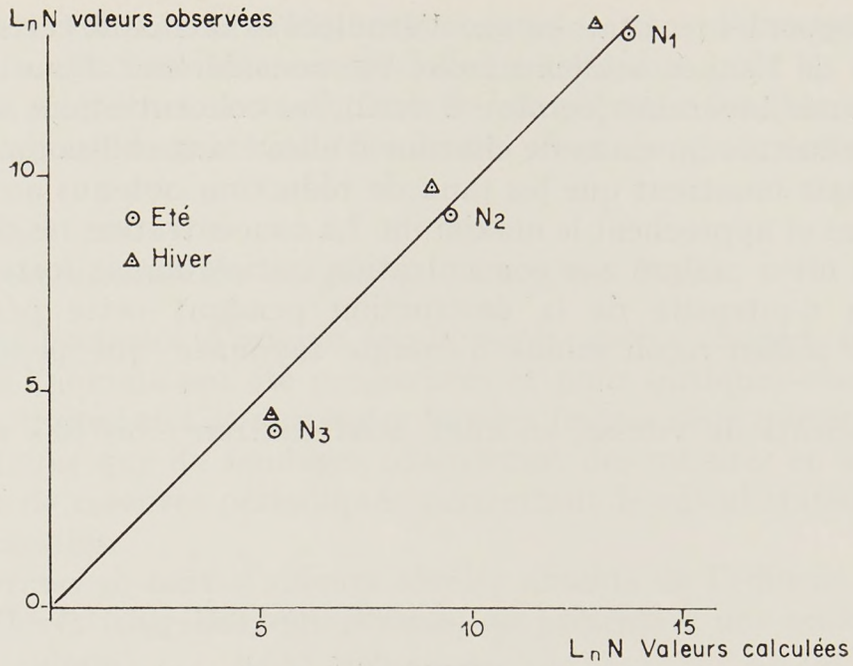


FIG. 1. — *Lagunage complet (Grau du Roi). Corrélation entre valeurs observées et valeurs calculées selon modèle exponentiel de la concentration N en* E. Coli *à la sortie des trois bassins en série :*

— bassin primaire $N = N_1$,
— deuxième bassin $N = N_2$,
— troisième bassin $N = N_3$.

Modèle exponentiel, dérivé de la loi de CHICK :

Taux de survie $\frac{N}{N_0} = e^{-Kt}$.

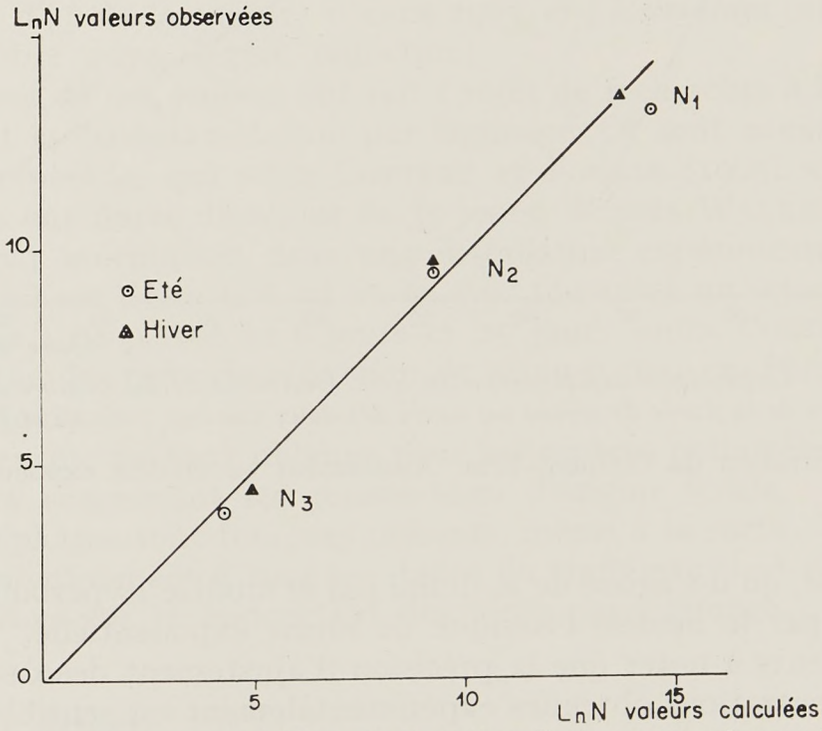


FIG. 2. — *Lagunage complet (Grau du Roi). Corrélation entre valeurs calculées selon modèle de* MARAIS et SHAW

$\frac{N}{N_0} = \frac{1}{1 + Kt}$ de la concentration N en *E. Coli* à la sortie des trois bassins en série.

Le tableau 1 donne, pour *Escherichia coli* à titre d'exemple, les concentrations moyennes par 100 ml de l'effluent brut (N_0) et l'effluent sortant des bassins successifs de la série étudiée (N1, N2, N3).

Pour regrouper les résultats en vue d'étudier l'influence de certains paramètres, deux périodes de l'année seulement ont été considérées : l'une estivale (mai à octobre) et l'autre hivernale (octobre à avril), les concentrations obtenues par les prélèvements effectués au cours de chacune d'elles étant suffisamment homogènes.

Les résultats montrent que les taux de réduction obtenus aux deux époques sont très voisins et approchent le maximum. La concentration résiduelle est un peu plus élevée en hiver malgré une concentration initiale moins forte, ce qui traduit une réduction d'intensité de la destruction pendant cette période, au cours de laquelle le milieu reçoit moins d'énergie rayonnée que pendant la période chaude.

Les coefficients de vitesse, en effet, sont environ trois fois moins élevés en

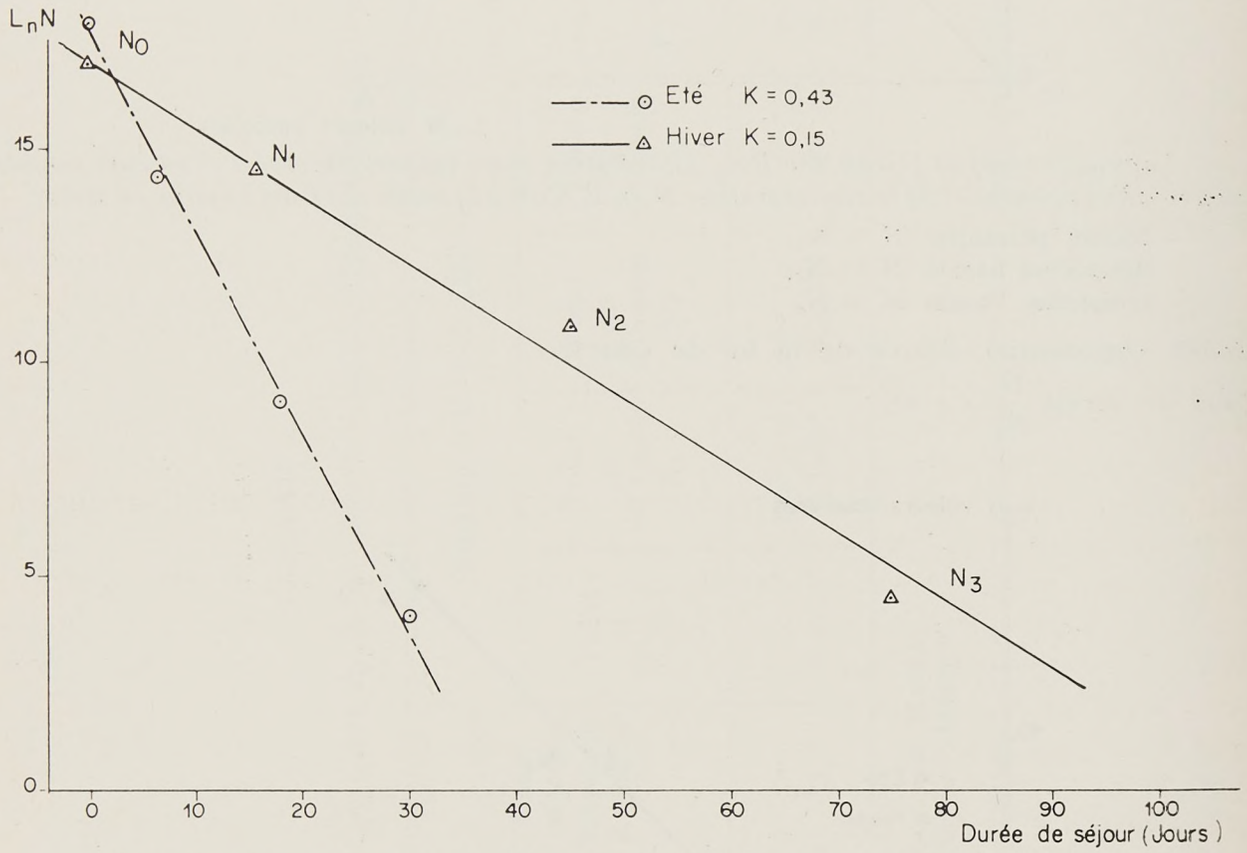


FIG. 3. — *Lagunage complet (Grau du Roi). Décroissance du nombre de* E. Coli *en fonction de la durée de séjour au cours des deux saisons, estivale et hivernale :*

N_0 = concentration de l'effluent brut. Ajustement au modèle exponentiel $\frac{N}{N_0} e^{-Kt}$

période hivernale, qu'il s'agisse de K défini par le modèle hyperbolique de MARAIS ou de k défini par le modèle classique de forme exponentielle.

Il est d'ailleurs à noter que la précision d'ajustement des deux modèles aux valeurs de concentrations obtenues expérimentalement est sensiblement la même, la différence des écarts étant peu significative comme le montrent les graphiques des figures 1 et 2. Par ailleurs, la précision reste constante dans les deux cas, quelle que soit la concentration et quelle que soit la saison, sauf en fin de traitement où la valeur calculée est toujours un peu excessive. Les bonnes corrélations obtenues aussi bien en hiver qu'en été, alors que les valeurs correspondantes des constantes cinétiques sont différentes, montrent que ces modèles restent valables à diverses températures ou pour diverses intensités d'énergie solaire reçues.

Des courbes de décroissance du nombre de germes ont été établies pour les

deux périodes, en retenant le modèle exponentiel à titre d'exemple (fig. 3). On constate que dans chacune des deux périodes, c'est-à-dire pour les mêmes conditions climatiques moyennes, le coefficient de vitesse reste sensiblement invariant avec la durée de séjour, dans la limite des durées observées (30 jours en été, 75 jours en hiver).

III.1.1.2. *Décontamination en germes pathogènes divers*

En plus des bactéries d'origine fécale, sept espèces choisies parmi les plus pathogènes pour l'homme ont été recherchées et pour quelques-unes dénombrées dans l'effluent à traiter et à la sortie des bassins (même série que précédemment). Il ne s'agit toutefois que de sondages comportant des mesures en nombre limité, et non de séries de mesures périodiques permettant le calcul statistique des rendements d'élimination.

Certains germes se sont d'ailleurs révélés absents de l'effluent dans tous les échantillons prélevés (shigelles, enterovirus) ou présents à une seule date de prélèvement (Clostridium).

Le tableau 2, qui donne les résultats de ces mesures, montre que les espèces dont la présence a été décelée dans certains échantillons ont été le plus souvent absentes dans l'effluent de sortie de la série de bassins; c'est le cas de *Salmonella agona*, de *Pseudomonas aeruginosa* (dans une seule série de prélèvement effectuée en juillet) et de mycobacterium. Les dénombrements ont révélé un rendement d'élimination notable pour quelques espèces : salmonelles (12 germes par ml avant l'entrée, non retrouvés dès la sortie du premier bassin), staphylocoque doré (réduction de 2 à 4 puissances de 10, soit 99 à 99,99 p. 100, efficacité particulière du troisième bassin d'après la mesure d'avril 1975) et *Clostridium* sulfito-réducteurs (décelés en octobre 1974, légère réduction).

Quelques-unes de ces espèces ont fait l'objet de recherches à l'étranger et en France, touchant la décontamination par lagunage. Ce sont notamment les salmonelles de la typhoïde, qui selon COETZEE et FOURIE (1965) sont détruites à 99,5 p. 100 après une durée de séjour de 35 jours; d'après WALKER *et al.* (1977), qui ont opéré par inoculation dans une installation expérimentale, déjà citée, *Salmonella overshie* est détruite à 99 ou 99,5 p. 100 après un séjour de 25 jours, les mycobactéries à 98 p. 100 en 6 jours et 25 jours; enfin COETZEE et FOURIE (1965) ont observé des taux de réduction de 99,69 p. 100 en *Pseudomonas aeruginosa* après 35 jours.

Il est à noter que les taux obtenus pour ces espèces pathogènes sont souvent inférieurs à ceux concernant les germes-tests d'origine fécale.

Les bactériophages sont toujours présents, même à la sortie. Une étude plus précise, avec dénombrement à tous les stades du traitement, est en cours dans le cadre de recherches sur la destruction des virus par lagunage.

III.12. *Lagunage tertiaire*

Les résultats relatifs à ce mode de traitement sont ceux issus des expériences de Marseillan et de Leucate.

III.121. *Essais de Marseillan*

Le tableau 3 donne tout d'abord pour les trois espèces les taux de décontamination après passage successif dans chacun des deux bassins de l'installation

TABLEAU 2

Destruction des germes pathogènes

Espèces recherchées. Nombre MPN/ml	8 juillet 1974		7 août 1974		24 octobre 1974		3 avril 1975			
	Entrée (1b)	Sortie (5b)	Entrée (1b)	Sortie (5b)	Entrée (1b)	Sortie (5b)	Entrée (1b)	Milieu 2e bassin (surface)	Milieu 2e bassin (fond)	Sortie (5b)
Shigella (/100 ml) . . .	Absence	Absence	Absence	Absence	—	—	—	—	—	—
Salmonella (/1)	Absence	Présence *S. brandenburg*	Présence *S. agona*	Absence	Absence	Absence	12 (minimum)	Absence	Absence	Absence
Pseudomonas aeruginosa (/1)	Présence	Absence	Présence	Absence	—	—	—	—	—	—
Staphylococcus aureus . .	10^5	10	0	0	10^3	10	10^6	10^3	10^4	10
Mycobacterium (/100 ml)	Présence	Absence	Absence	Absence	Présence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Clostridium sulfito-réducteurs	—	—	—	—	2×10^2	10^2	—	—	—	—

TABLEAU 3

Rendements d'épuration bactérienne (Marseillan)

Germes	Nombre d'E-Coli (MPN)			Taux de décontamination			
				1er bassin		2e bassin	
	Effluent (*) N_0	Sortie 1er bassin	Sortie 2e bassin N	p. cent	log N_0/N	p. cent	log N_0/N
Coliformes	1.10^9	17.10^8	16.10^8	83,6	1,06	84,7	1,07
Escherichia coli . . .	$2,9.10^8$	$1,6.10^8$	$1,6.10^7$	44	0,25	94,4	1,25
Streptocoques . . .	3.10^7	$2,3.10^7$	$7,7.10^5$	23	0,06	97,4	1,41

(*) Par convention ce terme désigne l'effluent non traité, avant son entrée dans le bassin primaire.

de Marseillan. Ces taux sont des moyennes calculées à partir de 15 prélèvements effectués au cours d'une période estivale de quatre mois.

Les taux de décontamination sont relativement peu satisfaisants, surtout ceux des coliformes, ce qui tient au fait que cette installation ayant été trop faiblement dimensionnée les temps de séjour, de l'ordre de quelques jours à deux semaines, sont insuffisants, relativement aux fortes concentrations de l'effluent admis dans les bassins. De plus la station primaire à l'amont de ces bassins ayant été court-circuitée pour fonctionnement défectueux pendant une longue période de la campagne, l'effluent admis dans les bassins a accusé des concentrations plus proches en moyenne de celles d'eaux d'égout brutes que de celles d'un effluent secondaire.

Toutefois des essais de calcul de K à partir de groupes de valeurs de N_0 et N correspondant à des durées de séjour déterminées ont montré que le coefficient n'était pas suffisamment indépendant de cette durée, ce qui est contraire à l'hypothèse de base du modèle. Un meilleur ajustement des résultats a été obtenu avec une relation exponentielle légèrement modifiée, définie par le taux de survie ci-dessous :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-1,57\,t^{0,5}}$$

et que nous appellerons relation « de Marseillan ». La décontamination ainsi exprimée est moins rapide que dans le cas de la loi exponentielle classique.

III.122. *Essais de Leucate*

a) *Efficacité de décontamination*

Comme dans le cas du lagunage complet, ces rendements moyens (tabl. 4) sont calculés en regroupant des résultats de périodes saisonnières successives caractérisées par des durées moyennes de séjour variées. Les mesures plus nombreuses qu'à Marseillan ainsi que le meilleur fonctionnement, dû à des dimensions plus rationnelles des bassins, ont permis de tirer de cette expérience des renseignements de valeur correspondante à celle de l'étude du lagunage complet.

TABLEAU 4

Rendement d'épuration bactérienne (Leucate)
Destruction des germes-tests fécaux

Période	Durée séjour R (jours)	Germes	Effluents N_0	Sortie dernier bassin N	Taux de décontamination globale	
					p. cent	$\log N_0/N$
Cycle total						
		E. Coli	$2,88.10^5$	8.10^1	99.972	3,65
		Coliformes	$5,35.10^5$	$1,5.10^2$	99.971	3,55
		Streptoc.	$6,17.10^4$	$1,3.10^1$	99.979	3,66
Été 1974	21					
		E. Coli	$6,5.10^5$	11.10^1	99.983	4,08
		Coliformes	$3,12.10^6$	$2,1.10^2$	99.993	4,18
		Streptoc.	$1,8.10^5$	$1,9.10^1$	99.989	4,09
Automne-hiver printemps	37					
		E. Coli	$3,55.10^5$	$1,8.10^1$	99.994	4,30
		Coliformes	$4,91.10^5$	3.10^1	99.994	4,21
		Streptoc.	$5,55.10^4$	4.1	99.993	4,19
Hiver	40					
		E. Coli	$4,8.10^5$	$2,2.10^1$	99.995	4,34
		Coliformes	$7,2.10^5$	$3,3.10^1$	99.995	4,34
		Streptoc.	$1,9.10^5$	4.0	99.998	4,67
Été 1975	17					
		E. Coli	$1,06.10^5$	$1,4.10^3$	98,68	2,08
		Coliformes	$1,76.10^5$	$2,7.10^3$	98.46	2,07
		Streptoc.	$3,5.10^4$	1.01^2	99.71	2,54

Le pH des effluents a été au cours du cycle de fonctionnement : effluent entrant, 7 à 8, effluent sortant 7,5 à 9,5.

(NB : Ce tableau se limite aux taux de décontamination entre l'entrée et la sortie de l'installation, donc aux taux globaux, excluant les taux bassin par bassin. Ceux-ci ont été toutefois pris en compte dans le calcul des constantes K spécifiques de chaque bassin, non publiées).

La première constatation est que les taux sont ici très élevés, la décontamination étant presque totale : la moyenne générale du taux $\left(\log \frac{N_0}{N}\right)$ sur la totalité du cycle est supérieure à 3,55 (99,97 p. 100) pour les trois groupes bactériens. De plus les taux d'été et ceux de la période d'hiver sont peu différents entre eux, ceux d'hiver étant pourtant légèrement supérieurs.

Par ailleurs, la décontamination finale est plus poussée, dans l'ensemble, que dans le cas du lagunage complet, ce qui est normal compte tenu de l'objectif d'épuration complémentaire recherché dans les bassins tertiaires.

Hormis l'étude de réduction des bactéries fécales, une recherche non quantitative des salmonelles a été effectuée : sur 13 prélèvements, la présence de cette

bactérie a été constatée dans trois des échantillons de l'effluent entrant, dans un seul à la sortie des premier et second bassins. Elle a été absente de tous les échantillons prélevés à la sortie du troisième bassin.

b) *Ajustement au modèle cinétique de* MARAIS

Bien qu'il s'agisse de bassins de finition, ayant effectivement assuré un traitement tertiaire, il est utile d'appliquer ici les mêmes essais d'ajustement que dans le cas des installations précédentes, puisque les modèles proposés sont par hypothèse valables quelle que soit la déconcentration initiale.

Utilisant une méthode par approche qui consiste à essayer des valeurs entières de K, on a porté ces valeurs dans l'équation $\frac{N}{N_0} = \frac{1}{1 + Kt}$.

Les valeurs essayées sont voisines de celles indiquées par MARAIS (1961), par exemple 2 pour *E. Coli*.

Des valeurs plus faibles ont été choisies pour la période d'été 1975, car c'est durant cette période qu'en raison d'une surcharge accidentelle l'installation a fonctionné pratiquement en lagunage complet.

Partant des concentrations initiales obtenues à chaque mesure, on a calculé les concentrations théoriques à la sortie des divers bassins, et on les a comparées aux valeurs effectivement observées. Les résultats ont montré que la meilleure concordance est donnée pour les valeurs suivantes :

$K = 3$ (1974)
$K = 2$ (autres saisons)
$K = 0{,}5$ (été 1975)

En reportant graphiquement les valeurs calculées et observées, l'examen de la droite de corrélation (fig. 4) met en évidence une erreur par excès des valeurs théoriques, notamment dans la zone des fortes concentrations (effluent brut et premiers bassins).

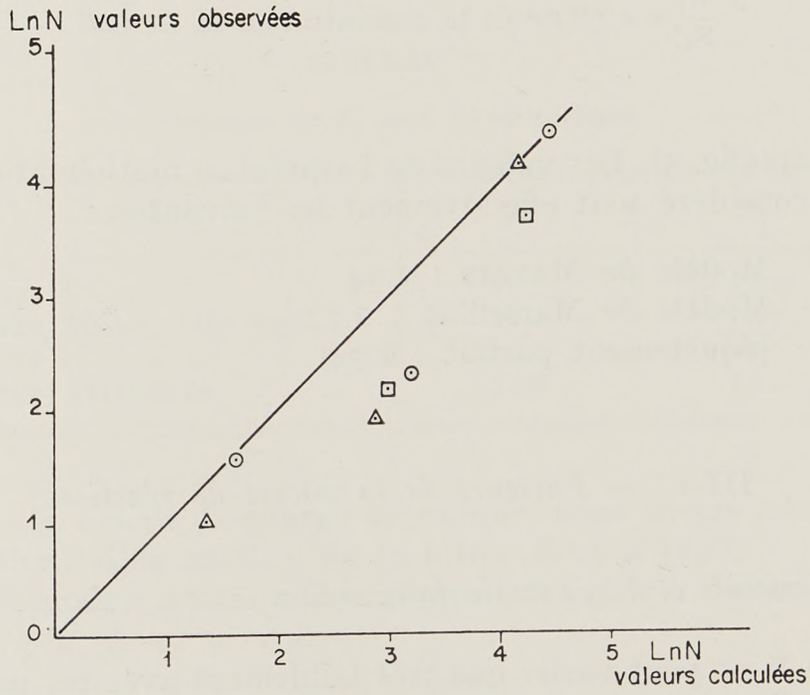


FIG. 4. — *Lagunage tertiaire (Leucate). Corrélation entre valeurs observées et valeurs calculées de la concentration en* E. Coli *selon modèle de* MARAIS *et* SHAW *à la sortie de la série de bassins.*

c) *Ajustement à la relation de Marseillan*

L'application de cette relation fournit des valeurs de K un peu différentes des précédentes, dans l'ensemble :

K = 2,0 (été 1974)
K = 1,6 (autres saisons)
K = 1,1 (été 1975)

La comparaison des concentrations finales calculées à l'aide de ces valeurs avec celles observées montrent une corrélation plutôt meilleure que dans le cas du

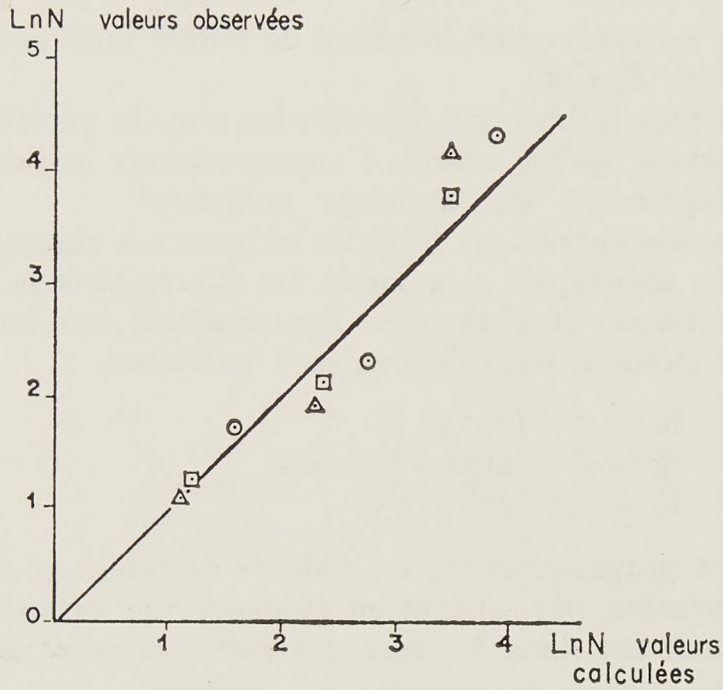


FIG. 5. — *Lagunage tertiaire (Leucate). Corrélation entre valeurs observées et valeurs calculées selon le modèle « de Marseillan » :*

$$\frac{N}{N_0} = e^{-1,57\, t^{0,5}}$$ de la concentration en *E. Coli*

modèle de MARAIS (fig. 5). Les valeurs de l'espérance mathématique dans l'intervalle de calcul considéré sont effectivement les suivantes :

Modèle de MARAIS : 2,34
Modèle de Marseillan : 2,77
(Ajustement parfait : 2,74)

III.2. — *Facteurs de la vitesse de réaction*

III.2.1. *Charge initiale et durée totale de rétention*

En principe K ne peut varier que très faiblement avec ces paramètres caractéristiques de l'effluent et de l'installation. Effectivement les écarts par rapport aux droites des graphiques sont faibles et ne peuvent résulter que de fluctuations

aléatoires des concentrations, ou même de celles de K sous l'influence d'autres facteurs variables, et non d'une variation systématique de ce coefficient.

On observe dans les graphiques établis par MARAIS et SHAW (1961), à partir des résultats obtenus sur une dizaine d'installations, un degré analogue de dispersion.

Selon ces auteurs, la constance du coefficient K est assurée, quelle que soit la charge bactérienne et la rétention, dans la mesure où s'applique le modèle théorique correspondant au régime de diffusion de la pollution, notamment l'équation hyperbolique dans le cas d'un bassin homogène.

Il devrait en résulter que les coefficients partiels pour chaque bassin d'une série soient égaux entre eux, et égaux au coefficient global pour l'ensemble de la série. Les calculs effectués tant sur les données du Grau du Roi que sur celles de Leucate nous ont montré que cette constance est sensiblement vérifiée, même pour le coefficient K du modèle exponentiel, sous réserve d'une diminution légère et progressive du premier au troisième bassin, c'est-à-dire corrélativement à la réduction de charge.

Ce phénomène est cependant loin d'être aussi marqué que dans le cas de la dégradation des charges organiques, où le rapport pouvait atteindre 2 entre la constante du premier bassin et celle de la série, ce qui attestait une forte sensibilité de la constante à une réduction de la charge (SAUZE, 1976).

III.22. *Influence de la température*

Ce facteur intervient en principe de la même façon que dans la dégradation des matières organiques, son accroissement accélérant les réactions biologiques. Ce sont surtout les données du lagunage tertiaire de Leucate, groupées en périodes saisonnières suffisamment nombreuses, qui ont permis l'établissement d'une loi précise de variation.

Les moyennes pondérées des températures et les valeurs de K sont données ci-dessous pour chacune de ces périodes (tabl. 5).

TABLEAU 5

Variation de K avec la température

Période	T	K
Été 1974	23	2,02
Automne, Hiver, Printemps	12,4	1,67
Hiver	9,4	1,66
Automne, Printemps	14,6	1,74

Comme dans le cas de la charge organique, nous avons retenu en première approche l'hypothèse d'un modèle de la forme $K = a\ (\theta)^{bT}$.

Cependant le modèle admis par la plupart des auteurs, dans une gamme de température de 2 °C à 21 °C soit

$$K = a\ \theta^{T-20}$$

(avec $a = 2{,}6$ et $\theta = 1{,}19$ selon MARAIS et SHAW)

n'a pas permis un ajustement parfait des résultats. Le meilleur modèle obtenu présente une forme doublement exponentielle :

$Ln\ (Ln\ K) = 0{,}254\ T - 0{,}948$ (coefficient de corrélation 0,996).

Il s'écrit également $= K = e^{e(0{,}0254T - 0{,}948)}$

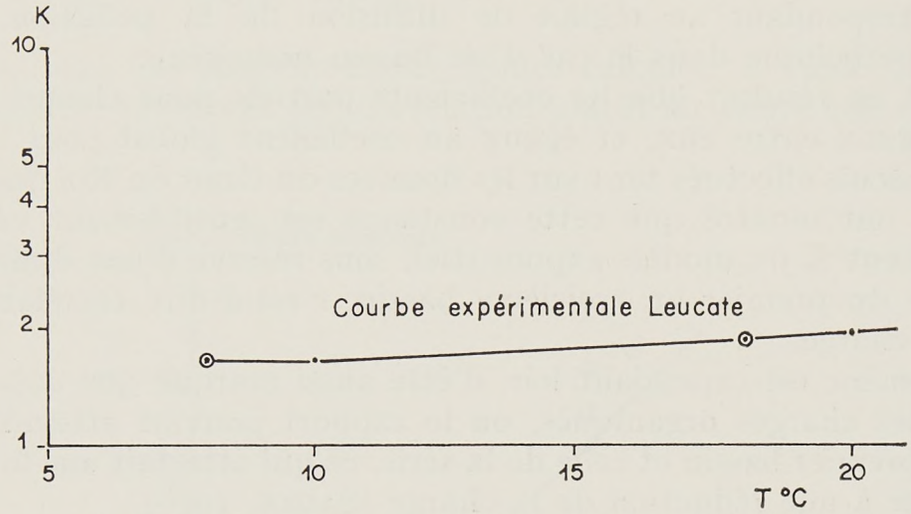


FIG. 6. — *Lagunage tertiaire (Leucate). Influence de la température du milieu sur la constante cinétique de décontamination en* E. Coli.

et se traduit par la courbe de la figure 6, qui s'éloigne très peu d'une droite inclinée, au-dessus d'un seuil de température de 10 °C. Au-dessous de ce seuil, K reste sensiblement constant, et s'accroît ensuite d'environ 1,7 p. 100 par °C.

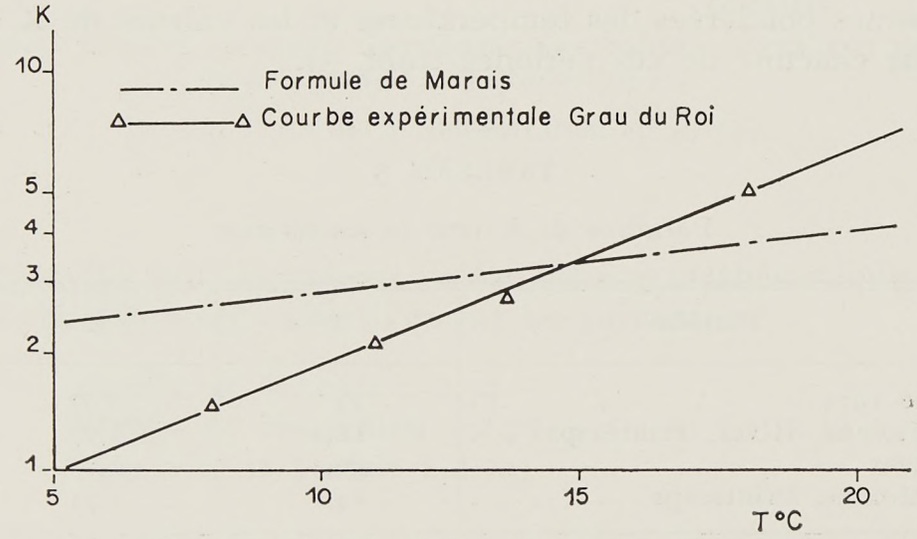


FIG. 7. — *Lagunage complet (Grau du Roi). Influence de la température du milieu sur la constante cinétique de décontamination en* E. Coli (lagunage complet).

Comparaison avec la formule de MARAIS $K = 2{,}6^{T-20}$

La courbe correspondante a été établie dans le cas du lagunage complet (fig. 7), avec toutefois deux points seulement d'après les moyennes saisonnières. L'influence de la température sur la vitesse de réaction est nettement plus élevée que dans le cas du lagunage tertiaire.

III.2.3. *Influence de l'énergie reçue*

A défaut de mesure directe du rayonnement solaire visible dans la région, nous avons utilisé ses valeurs probables en fonction de la latitude et du mois, d'après un barême semi-empirique d'OSWALD (exemple : pour 43° de latitude Nord, en été 236 cal/cm²/jour, en hiver 80 cal/cm²/jour).

L'analyse des valeurs de K trouvées à Leucate, selon la même méthode que précédemment, conduit à retenir l'expression (cas d'*E. Coli*) :

$$K = e^{1,581.10^{-15}E^6+0,504} \qquad E = \text{énergie solaire visible}$$

Il s'agit ici encore d'une exponentielle à croissance peu rapide malgré l'exposant de E, du fait du faible coefficient numérique de ce paramètre. On peut noter que K ne peut être inférieur à $e^{0,504} = 1,65$, valeur correspondant à une énergie

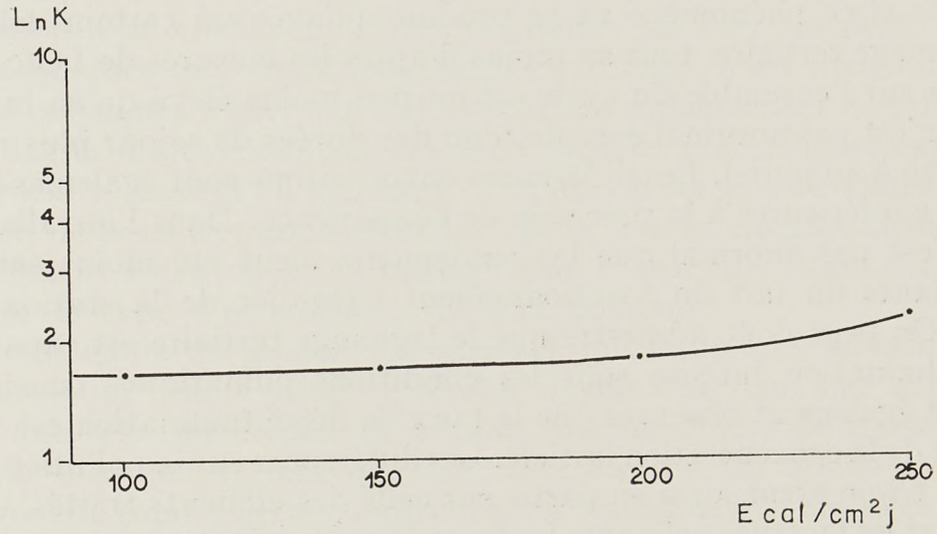


FIG. 8. — *Lagunage tertiaire (Leucate). Influence de la quantité d'énergie solaire visible reçue sur la constante cinétique de décontamination en* E. Coli *(lagunage tertiaire).*

nulle, ce qui traduit le fait qu'une mortalité bactérienne existe dans ces eaux même à l'obscurité.

Le graphique figure 8 montre l'allure de la croissance de la constante, qui comporte effectivement une phase très lente jusqu'à un seuil d'énergie d'environ 100 cal/cm²/jour.

IV. — Discussion

IV.1. — *Niveaux de performance des installations. Rendements, contaminations résiduelles, vitesse de décontamination*

Bien que le choix de l'espèce *E. Coli* comme critère principal dans l'évaluation des rendements de décontamination n'ait pas une valeur rigoureuse, il est le plus généralement adopté. Le taux d'élimination de ce germe se place souvent entre celui des coliformes et celui des streptocoques, dont le taux de décontamination est en général élevé.

En lagunage complet, le taux de réduction d'*E. Coli* accuse très peu l'influence

saisonnière, ceci malgré une assez forte différence d'énergie reçue par les bassins entre l'hiver et l'été, qui se traduit, comme il sera précisé ci-dessous par une variation importante de la vitesse de réaction. L'explication la plus plausible est que les durées de séjour importantes constatées en hiver, variant entre 30 et 100 jours, compensent la diminution d'énergie reçue.

En outre on peut penser que la turbidité élevée régnant dans un lagunage complet atténue notablement l'influence de l'énergie reçue, ce qui expliquerait également que l'influence saisonnière ne soit pas très marquée.

Il est à noter que l'incidence des phénomènes entraînés par la décantation, qui est importante dans ce type de lagunage appliqué à des effluents bruts, ne peut être abordée dans la présente étude. Il subsiste donc une part d'incertitude sur la survie éventuelle de bactéries fixées et entraînées par les boues se déposant au fond des bassins. On peut toutefois observer qu'en raison de la longue durée de la campagne d'essai, les valeurs moyennes des concentrations bactériennes de l'effluent traité tiennent compte des relargages éventuels dans le liquide à partir des sédiments, même si ce phénomène ne se produit qu'avec un certain délai.

En lagunage tertiaire, tout au moins d'après les mesures de Leucate, le rendement moyen sur l'ensemble du cycle est un peu moins élevé qu'en lagunage complet, ce qui n'est pas anormal compte tenu des durées de séjour plus réduites dans l'ensemble (20 à 40 jours). Les différences entre saisons sont également très faibles, et sans doute inférieures à la précision de l'expérience. Dans l'installation de Marseillan, il n'est pas anormal que les rendements aient été moins satisfaisants et moins constants du fait du fonctionnement irrégulier de la station d'épuration secondaire. On peut donc admettre que le lagunage tertiaire est capable d'assurer une décontamination intense sous les conditions climatiques considérées.

On peut également observer que le taux de décontamination est relativement indépendant de la concentration initiale. Les différences sur la pollution des effluents à l'entrée se répercutent ainsi en partie sur celle des effluents traités, et ceci implique que parmi les facteurs polluants les taux de contamination soient pris en compte avec un soin particulier pour le calcul des installations.

Ces rendements de décontamination en germes fécaux confirment sensiblement, en ce qui concerne le lagunage complet du Grau du Roi, ceux qui résultaient de l'étude effectuée antérieurement sur cette installation. Ils sont dans l'ensemble égaux ou supérieurs à ceux rapportés dans la littérature, notamment par MARAIS et SHAW (1961), WALKER et LECLERC (1973, 1974), MARAIS (1974). Les rendements relevés par MARAIS dans une dizaine de stations d'Union Sud-Africaine avec des temps de séjour variés s'échelonnent entre 98,00 et 99,90 p. 100. WALKER et LECLERC à Lille citent un rendement de 99,63 p. 100 pour *E. Coli*, obtenu en traitant en 66 jours dans des bassins expérimentaux un milieu faiblement contaminé (eau de la Deule, 10^2 à 10^3 germes par 100 ml).

NEEL *et al.* (1961) ont relevé des rendements moyens voisins de 99,99 p. 100 avec des durées de 17 à 87 jours dans les bassins de Fayette (USA), d'une superficie de 8 ha et sous un ensoleillement peu différent de celui du Languedoc.

Les taux de décontamination des autres espèces d'origine fécale sont du même ordre de grandeur, sauf ceux des streptocoques en lagunage complet, plus élevés que ceux des *E. Coli* et coliformes. Les résultats chiffrés relatifs aux espèces pathogènes, obtenus au Grau du Roi et à Leucate, sont trop peu nombreux pour permettre le calcul des rendements, mais on peut observer que ces résultats sont pour la plupart supérieurs à la moyenne de ceux issus des mesures de contrôle de fonctionnement des stations d'épuration. Ces mesures sont, il est vrai, peu fréquentes : du fait qu'aucune norme bactériologique n'est légalement imposée en France pour les

rejets, on se contente le plus souvent de mesurer les demandes en oxygène et les matières en suspension.

Les concentrations résiduelles ne se sont montrées un peu excessives que durant des périodes critiques où certains paramètres ont pris des valeurs élevées, parfois simultanément : par exemple la température, ainsi que la charge à l'entrée qui a marqué des pointes anormales à Marseillan et à Leucate.

Ces performances sont nettement supérieures à celles rapportées dans la plupart des études de fonctionnement des stations d'épuration biologique à boues activées ou à lits bactériens. Seuls les procédés anaérobies, non utilisés en France sauf pour traiter les boues d'épuration, et de préférence suivis d'un lagunage tertiaire, sont actuellement capables de les dépasser.

Les taux de décontamination des tableaux 1 et 3 peuvent être retenus comme bases du calcul dimensionnel d'installations de lagunage situées sous des climats analogues effectué d'après les normes de rendement en épuration des matières organiques, dont une approche a été rapportée en première partie du mémoire.

L'utilisation d'un coefficient cinétique, défini par l'un des deux modèles que nous avons appliqués aux conditions locales précitées, n'est nécessaire que si les températures moyennes d'hiver et d'été s'écartent notablement de celles des expériences. Les degrés d'ajustement de ces deux modèles aux données expérimentales étant assez voisins, surtout en lagunage complet, on ne pourra choisir l'un d'eux qu'en fonction de la conception des installations (forme, nombre de bassins, distribution de l'effluent à l'entrée et au passage d'un bassin au suivant dans une série), qui influe sur le type d'écoulement du flux polluant.

Toutefois le choix du modèle exponentiel, qui s'applique en principe en cas d'un écoulement du type « piston », semble devoir être dans une majorité de cas plus justifié que celui du modèle de MARAIS, car les durées de transit habituellement pratiquées ne permettent que rarement un état du milieu approchant de près l'homogénéité totale. Cette condition n'est réalisable que dans des installations de très petite dimension où le nombre de bassins est faible (un ou deux) et où le milieu est fortement agité, par exemple en région ventée.

IV.2. — *Variation du coefficient K avec la température*

L'extrapolation des rendements à des zones de climat plus ou moins chaudes est possible à l'aide des courbes des figures 5 et 6, si l'on admet avec beaucoup d'auteurs que la température du milieu est le paramètre déterminant du coefficient cinétique, et que celui-ci ne subit que des variations négligeables lorsque varient d'autres facteurs : charge polluante et durée de rétention en particulier.

Nous admettrons d'autre part que la température agit essentiellement par son influence sur K, bien que son action sur les rendements puisse s'exercer d'autres manières, par exemple par l'intermédiaire de l'évaporation qui concentre le milieu.

La formule K (T) proposée par MARAIS et SHAW (1951) : $K_T : 2{,}6\ (1{,}19)^{T-20}$ est de même structure que celle qu'ils avaient établie pour la réduction de DBO_5.

Cependant DUNCAN MARA (1975) considère cette formule seulement pour des températures inférieures à 15 °C, et il ressort des valeurs calculées de K que la durée de séjour nécessaire par exemple, pour un rendement donné, à 19 °C serait la moitié de celle nécessaire à 15 °C.

Parmi les rares auteurs ayant établi des constantes cinétiques de dégradation bactérienne par lagunage, WALKER *et al.* (1977) citent des valeurs de 0,23 à 0,30 pour celle d'*E. Coli*, mais sans indiquer la température du milieu. Ces vitesses

apparemment faibles peuvent s'expliquer par la grande différence de charge organique entre les eaux de rivière utilisées, même relativement polluées, et les effluents d'égout.

La comparaison des courbes traduisant la formule de MARAIS-SHAW d'une part, et des résultats obtenus au Grau du Roi d'autre part, montre que l'influence de la température est analogue dans les deux cas, bien que pour une température donnée la vitesse soit nettement plus élevée dans le second. Selon MARAIS, on observe parfois au-dessus de 21 °C une légère baisse des rendements provoquant une diminution apparente de K, mais qui serait due à des phénomènes de stratification thermique dans la tranche d'eau. Nous avons plutôt, pour notre part, observé de telles diminutions dans le cas de la cinétique de destruction des matières organiques (voir première partie).

En lagunage tertiaire, la vitesse croît beaucoup moins avec la température comme le montre la courbe de la figure 6, fait dont on trouve difficilement l'interprétation dans la littérature, car les résultats de mesure de vitesses de réaction sont souvent présentés sans que soit précisé le type d'exploitation auquel appartiennent les bassins. L'explication la plus plausible est que la charge organique initiale est faible, et surtout relativement constante selon la saison, du fait qu'une épuration secondaire a été déjà subie par l'effluent. Or, la destruction des bactéries est due pour une part importante à la concurrence d'autres micro-organismes, principalement le phytoplancton et le zooplancton, et l'activité de ces organismes augmente non seulement avec la température mais également avec la richesse du milieu nutritif, nettement plus élevée en lagunage intégral qu'en tertiaire. (Les populations d'algues mesurées à Leucate ont été de 10 à 100 fois moins élevées qu'au Grau du Roi.)

Quoi qu'il en soit, le résultat positif est l'obtention de normes de calcul pour les deux catégories de stations, normes valables dès lors que l'on connaît la température de réaction. Les indications données sur ce point dans les conclusions de la première partie s'appliquent également au cas de l'épuration bactérienne.

La formule proposée pour traduire la variation de K avec l'énergie reçue par les bassins, pour être applicable, demandera confirmation par des mesures au solarimètre sur les lieux d'expérience.

V. — Conclusions

Les données résultant des campagnes de mesures menées sur bassins de lagunage complet et sur bassins tertiaires, et exploités en choisissant pour critère la décontamination en germes-test d'origine fécale, sont en bonne concordance avec les lois de biodégradation admises le plus couramment : leur ajustement est pratiquement aussi satisfaisant avec l'équation cinétique classique du premier ordre à forme exponentielle qu'avec le modèle de MARAIS-SHAW. En lagunage tertiaire, l'ajustement le meilleur est fourni par un modèle exponentiel dont l'exposant est légèrement modifié et qui fournit des valeurs un peu différentes de la constante cinétique (K).

Les rendements résultant en bactéries-test éliminées sont au moins égaux sinon supérieurs à ceux relevés dans diverses enquêtes effectuées dans des pays de climats différents. Ils varient relativement peu au cours du cycle annuel, en raison des caractéristiques de fonctionnement des installations suivies : les fortes

pointes de charge des effluents constatées en période estivale y sont en majeure partie écrêtées par l'effet tampon des bassins de lagunage, et de surcroît compensées par l'augmentation de la décontamination avec la température.

Les constantes cinétiques de réaction (K) sont pratiquement indépendantes de la durée de séjour ou de la charge initiale, tant en lagunage complet qu'en lagunage tertiaire : contrairement à ce qui s'observe dans le cas de la dégradation des matières organiques, la constante, et par conséquent le modèle correspondant, est valable non seulement pour le traitement dans chaque bassin d'une série indi-

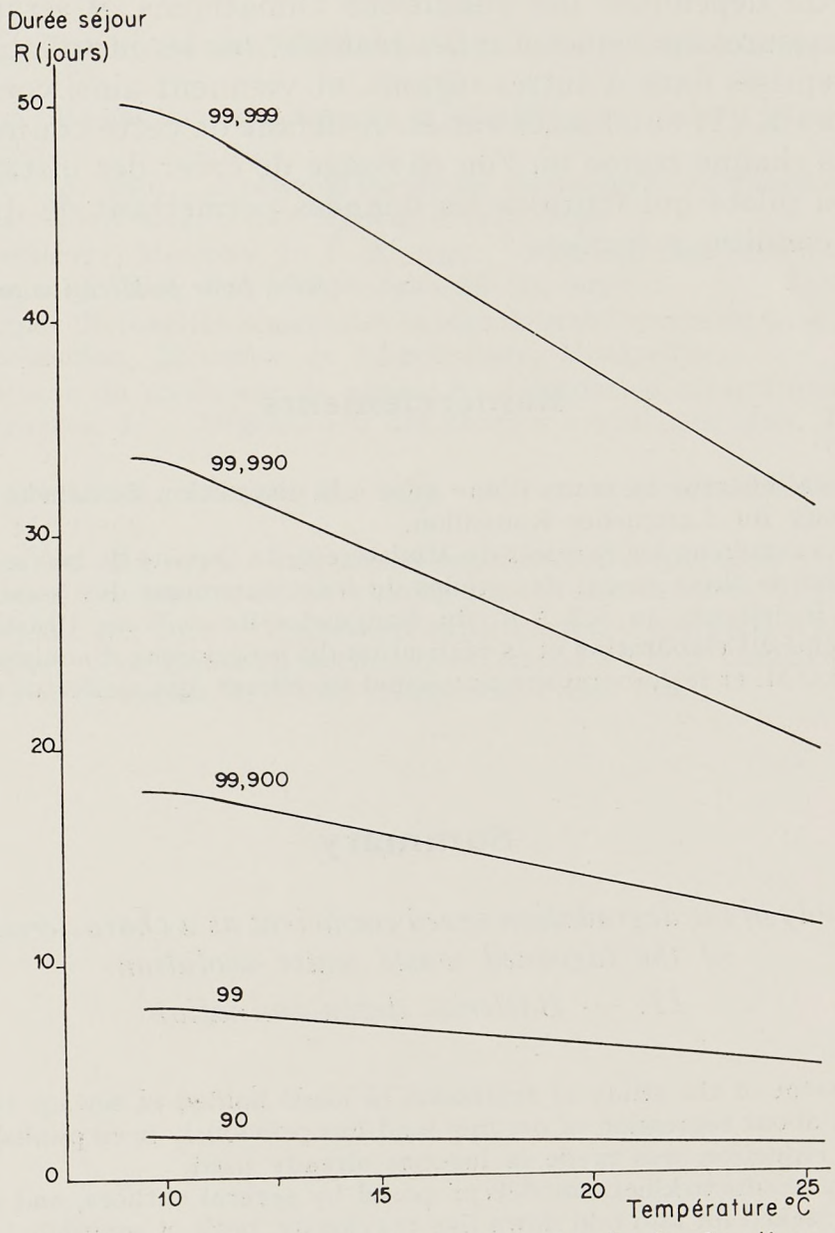


FIG. 9. — *Lagune tertiaire (Leucate). Courbes des durées de séjour nécessaires en fonction de la température et du taux de décontamination recherché.*

viduellement, mais même pour le traitement global dans l'ensemble de la série. Il n'y a donc pas lieu de considérer à part le bassin primaire dans le calcul dimensionnel des installations selon le critère bactériologique.

La loi de variation de la constante cinétique en fonction de la température du milieu liquide est de même forme que dans le cas de la destruction des matières organiques; toutefois, on constate une différence de sensibilité à ce paramètre dans les deux types de traitement, la croissance de la constante étant plus forte en lagunage complet que dans les bassins tertiaires.

Les courbes fournissant les valeurs de K pour une température donnée, correspondant à une moyenne mensuelle ou saisonnière, permettent de calculer les durées minimales de séjour assurant la décontamination requise, qui pour les effluents domestiques courants ne doit pas être inférieure à 99,99 p. 100 d'élimination d'*E. Coli*. L'abaque de la figure 9 (lagunage tertiaire) donne plus directement ce résultat. La durée obtenue ne sera prise en compte qu'après confrontation avec celle issue du calcul similaire qu'il convient d'effectuer à l'aide de la formule de dégradation des matières organiques.

La température du milieu n'étant pas forcément, malgré son importance, le seul paramètre dépendant des conditions climatiques, il serait utile que des campagnes de mesures analogues à celles réalisées sur les installations du Languedoc soient entreprises dans d'autres régions, et viennent ainsi conforter l'applicabilité des courbes K (T) en climats variés. A défaut de cette confirmation, il serait nécessaire, dans chaque région où l'on envisage de créer des installations, de prévoir une station pilote qui fournira les données permettant de dresser la courbe spécifique des conditions locales.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Remerciements

Ce travail a été effectué au cours d'une mise à la disposition du Service régional de l'Aménagement des Eaux du Languedoc-Roussillon.

Nous tenons à remercier les Services du Ministère de la Qualité de la Vie et de l'Environnement qui ont permis le financement des études de fonctionnement des bassins de stabilisation (crédits du FIANE délégués au S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon); l'Institut Bouisson-Bertrand, qui a participé à l'élaboration et la réalisation du programme d'analyses bactériologiques ainsi que le B.C.E.O.M. et le Laboratoire municipal de Nîmes, qui a effectué des analyses d'eau.

Summary

Study of the degradation speed coefficient as a characteristic of the lagooned waste water evolution

II. — Bacterial decontamination

As a complement of the study of regression of loads holded in sewage treated in lagoons, of which first part about regression of organic load has previously been published, series of measures of bacterial reduction was made in lagoons already used.

Adjustment of results to kinetic models proposed by several authors, and suitable for faecal bacteria, has been seeked for and laid down like previously, both in complete lagooning case and in tertiary lagooning one.

Formula and graphics adapted to local conditions was also obtained with collected data, for checking basic parameters usefull to lagoons construction, as fonctions of received light energy.

Références bibliographiques

ANONYME, 1975. Étude des conditions de fonctionnement des bassins de stabilisation de Leucate. (S.R.A.E., du Languedoc-Roussillon, Ministère de l'Agriculture, Montpellier; B.C.E.O.M.).

BUTTIAUX, 1958. Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique de l'eau. *Rev. Hyg. Med. Soc.*, **6**, 170-192.

COETZEE O. J., FOURIE N. A., 1965. The efficiency of conventionnal sewage purification works, stabilization ponds, and maturation ponds with respect to the survival of pathogenic bacteria and indicator organisms. *J. Inst. Sewage Purif.*, Part III, 210-215.

DAVIS E. M., GLOYNA E. F., 1972. Bacterial die off in ponds. *J. Sanitary Engin. Div., ASCE*, n° SA 1, 59-69.

DUNCAN MARA D., 1975. Proposed design for oxydation ponds in hot climates. *J. environ. Eng. Div.*, EE2, 296-300.

ECK H., VAN, 1960. Theory of stabilization ponds, and their implications on their design and operation. Proceeding of specialist meeting on water treatment. Pretoria. 279-295. Commission for Technical Cooperation in Africa, London (England).

ECKENFELDER W. W. Jr., O'CONNOR D. J., 1961. *Biological waste treatment.* Pergamon Press. New-York.

GLOYNA E. F., 1972. Bassins de stabilisation des eaux usées. *Organisation mondiale de la Santé.* Genève, 101-104.

MARAIS G. R., 1974. Faecal bacterial kinetics in stabilization ponds. *J. Environm. Eng. Div.*, n° EE 1, 119-139.

MARAIS G. R., SHAW V. A., 1961. A rational theory for the design of stabilization ponds in Central and South Africa. *Civil Eng. South Agrica*, **3** (11), 1-20.

NEEL J. K., Mc. DERMOTT, MONDAY Jr. C. A., 1961. Experimental lagooning of raw sewage at Fayette, Missouri. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.*, **33** (6), 603-641.

SAUZE F., 1975. Étude du fonctionnement des bassins de stabilisation du Grau du Roi (S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon, Ministère de l'Agriculture, Montpellier).

SAUZE F., 1977. Étude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées. I — Dégradation des charges organiques. *Ann. Technol. agric.*, (à paraître).

WALKER J., CARBONNELLE B., LECLERC H., 1977. Auto épuration microbienne par lagunage. *Water Research*, **11**, 17-29.

WALKER J. E., LECLERC H., 1973. Traitement expérimental d'épuration d'une eau de surface par lagunage : aspects chimiques et microbiologiques. *Water Research*, **7**, 707-728.

WALKER J. E., LECLERC H., 1974. Traitement expérimental d'épuration d'une eau de surface par lagunage : aspects écologiques et biochimiques. Rapport à la 7e Conférence internationale de Recherche sur la Pollution de l'Eau. Pergamon Press. Ltd.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27**, (2), 533-564.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

La digestion anaérobie
Application aux industries agro-alimentaires

P. COUPLET et G. ALBAGNAC

Station de Technologie Alimentaire, C.E.R.T.I.A.,
369, rue Jules-Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq

Résumé

Une maîtrise complète de la digestion anaérobie passe nécessairement par la compréhension des phénomènes biochimiques et microbiologiques. C'est pourquoi ceux-ci font l'objet de la partie la plus importante de cette mise au point. Le bilan des connaissances dans ce domaine, aussi bien pour la phase d'acidogenèse que pour la phase de formation du méthane est discuté et les points qui restent obscurs sont dégagés.

Sur un plan plus pratique, les principaux procédés de digestion sont décrits et caractérisés. Puis un exemple d'application, d'un modèle mathématique simple, à ces différents types de digesteurs est donné.

Enfin, les applications actuelles et le développement possible de la digestion anaérobie dans le domaine particulier des industries alimentaires, dont les rejets semblent souvent bien se prêter à un traitement anaérobie, sont présentés.

Mots clés : *digestion anaérobie, biochimie, microbiologie, procédés, application développement, industries alimentaires.*

Du point de vue du technologue, l'action des microorganismes sur un substrat peut présenter bien des aspects dont les principaux sont : la production de biomasse, la biosynthèse d'un métabolite et l'élimination du substrat. Il en est ainsi pour la fermentation méthanique qui peut être envisagée soit comme un moyen de produire du méthane donc de l'énergie, soit comme une méthode d'élimination de certains produits indésirables. Il est évident que l'on cherchera à cumuler les deux avantages.

La valorisation par fermentation de sous-produits comme le fumier ou la paille, par exemple, permet d'obtenir de l'énergie tout en éliminant ces sous-pro-

duits. De même, l'utilisation de la fermentation méthanique pour épurer des eaux résiduaires conduit à la production de méthane qui est récupérable.

Ce mode d'épuration biologique, par voie anaérobie est appliqué dans plusieurs procédés :

— les lagunes qui occupent un espace important à cause de la lenteur des processus biologiques à température ambiante,

— les fosses septiques à usage domestique,

— la digestion anaérobie qui peut se faire à température plus élevée et qui permet de récupérer le méthane.

La digestion anaérobie, par rapport à l'épuration biologique par voie aérobie, présente certains avantages :

— pas de dépense d'énergie pour aérer le milieu,

— possibilité de traiter des suspensions d'éléments grossiers très denses puisque le problème de la diffusion de l'oxygène ne se pose pas,

— production de biomasse faible (on observe une minéralisation importante),

— la production du méthane entraîne un bilan énergétique très favorable si le gaz est récupéré et utilisé,

— une dénitrification importante est possible,

— la destruction des microorganismes pathogènes est importante.

Cependant, certains inconvénients viennent gêner le développement de cette méthode d'épuration :

— sa mise en œuvre est délicate car les conditions physico-chimiques à respecter sont très strictes,

— des traitements complémentaires sont souvent nécessaires pour deux raisons : d'abord, comme les eaux traitées par cette voie sont fréquemment très chargées (jusqu'à une DCO de l'ordre de 100 000 mg/l), l'effluent des digesteurs ne sera pas suffisamment épuré pour être rejeté en rivière, même si le rendement d'épuration est satisfaisant. De plus, il reste dans l'effluent des produits acides et des composés azotés comme l'ammoniac,

— un chauffage et une homogénéisation du contenu du digesteur sont nécessaires au bon fonctionnement de la digestion.

Actuellement, la digestion anaérobie est surtout utilisée pour le traitement des boues en excès dans les stations d'épuration. Cependant, certains effluents, en particulier des effluents d'industries alimentaires, sont trop concentrés pour être traités par voie aérobie sans dilution préalable mais peuvent faire l'objet d'un traitement anaérobie. Le rendement d'épuration par la digestion anaérobie peut atteindre 95 p. 100 et le méthane permet un gain d'énergie très important au niveau d'une station.

L'intérêt que présente la digestion anaérobie pour l'épuration des rejets des industries alimentaires nous a conduits à rassembler les connaissances actuellement acquises sur ce sujet. Nous envisagerons tout d'abord les aspects biochimiques et microbiologiques du métabolisme anaérobie des bactéries en essayant de dégager les points qui demandent des éclaircissements pour une meilleure compréhension de l'épuration. Puis nous présenterons, assez rapidement, les principaux procédés de digestion qui sont utilisés et leurs caractéristiques essentielles. Nous décrirons ensuite le modèle mathématique le plus généralement admis et ses applications aux différents procédés. Enfin, nous ferons le point sur l'application de la digestion à l'épuration des eaux résiduaires des industries alimentaires en précisant les possibilités de développement.

I. — Biochimie et microbiologie

La digestion anaérobie est caractérisée par l'existence de deux phases distinctes dans le processus de dégradation des substrats. La première phase conduit à la formation d'acides gras volatils, d'ammoniac, de gaz carbonique et d'hydrogène; puis le méthane et un surplus de gaz carbonique sont produits à partir des acides au cours d'une deuxième phase (fig. 1). Les différentes voies métaboliques impliquées dans le métabolisme anaérobie des bactéries ont été rassemblées et discutées par KOTZE, THIEL, HATTINGH (1969).

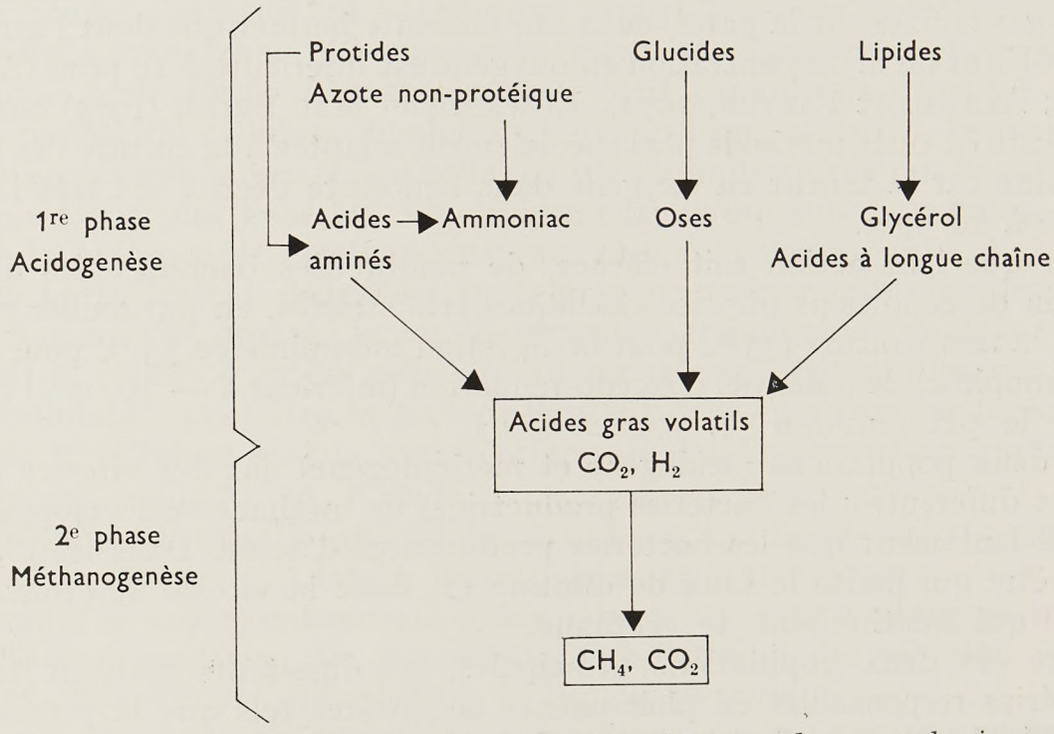


FIG. 1. — *Voies générales de formation du méthane et du gaz carbonique par digestion anaérobie des matières organiques.*

Ce sont des populations bactériennes différentes qui sont responsables de chacune de ces deux phases. La nature du substrat peut conditionner la composition qualitative de la population responsable de la première phase et pour un même substrat les espèces qui produisent des acides gras sont souvent très variées. Par contre, les espèces capables de produire du méthane sont peu nombreuses et très spécifiques.

Presque toutes les bactéries anaérobies strictes ou facultatives sont susceptibles d'exister dans les digesteurs. Toutefois, les anaérobies strictes sont les plus nombreuses. Ainsi, THIEL *et al.* (1968) trouvent en moyenne 253 fois plus d'anaérobies strictes que d'aérobies ou anaérobies facultatives.

Pour mettre en évidence l'importance relative d'une bactérie, il faut préciser son nombre par rapport à la population totale, et ses propriétés en fonction des réactions connues de la digestion ou des besoins des autres bactéries. Le dénombrement des bactéries est difficile et imparfait pour plusieurs raisons (HOLSON, BOUSFIELD, SUMMERS, 1974) : Les conditions de culture retenues pour estimer la population totale des digesteurs sont celles qui donnent le plus grand nombre et la plus grande variété de bactéries. Mais ce n'est souvent qu'une approxi-

mation du nombre de germes vivants. De plus, le fait de transférer les bactéries d'un milieu où les concentrations en nutriments sont faibles (digesteur) dans un milieu de culture nécessairement plus concentré peut tuer certaines bactéries à cause d'un choc osmotique. Enfin il est difficile de séparer les bactéries des particules en suspension sans endommager les cellules. Les résultats n'ont donc qu'une valeur relative et encore faut-il traiter des échantillons de même composition physique avec les mêmes méthodes.

Les techniques de culture des bactéries des digesteurs sont délicates car certaines bactéries sont très sensibles à la présence d'oxygène. Un premier procédé consiste à balayer la surface du milieu de culture avec une atmosphère contrôlée (CO_2 ou mélanges CO_2/H_2) dépourvue d'oxygène. La technique originellement décrite par HUNGATE en 1950 a été utilisée et perfectionnée par différents auteurs (WOLFE, 1971; HOBSON, 1973). La deuxième technique consiste à manipuler, à l'aide de gants fixés sur la paroi, dans une enceinte hermétique dont l'atmosphère est contrôlée et où la concentration en oxygène est inférieure à 10 ppm (ARANKI *et al.*, 1969; ARANKI et FRETER, 1972). EDWARDS et MAC BRIDE (1975) ont proposé une variante de cette méthode plus spécialement adaptée à la culture des bactéries du méthane car la teneur en oxygène dans l'enceinte décrite est très largement inférieure à 10 ppm.

Pour que leur action soit efficace, de nombreuses bactéries des digesteurs ont besoin de conditions physico-chimiques très strictes, en particulier en ce qui concerne la température (35 °C pour la digestion mésophile ou 55 °C pour la digestion thermophile), le potentiel d'oxydo-réduction (inférieur à — 350 mV) (TAYLOR, 1975) et le pH (environ 7).

Les deux populations (acidogène et méthanogène) ont des vitesses de croissance très différentes; les bactéries productrices de méthane se développent beaucoup plus lentement que les bactéries productrices d'acide. Dans les digesteurs, le paramètre qui limite le taux de dilution est donc la vitesse de croissance des bactéries qui synthétisent le méthane.

Outre ces deux populations principales, les digesteurs peuvent renfermer des bactéries responsables de phénomènes accessoires tels que la production de sulfure d'hydrogène ou la dénitrification.

1. — *L'acidogenèse*

Le phénomène d'acidification du milieu en l'absence d'oxygène n'est ni exceptionnel, ni spécifique de la digestion. Il fait partie au contraire de processus de fermentation très généraux qui sont utilisés depuis longtemps dans divers procédés de fabrication de produits alimentaires.

a) *Généralités, mécanismes.*

Les acides organiques proviennent des composés azotés, des glucides ou des lipides. Les glucides semblent toujours être la principale source d'énergie des bactéries de la digestion.

a.1. *Glucides*

L'utilisation des glucides passe d'abord par la dégradation des polymères et de la cellulose en particulier, qui aboutit aux oses. La cellulose est un polymère

de glucoses liés en β-1,4 et il en existe différentes formes plus ou moins biodégradables. Dans les végétaux, les chaînes de glucose sont groupées en fibrilles qui comprennent des zones cristallines très ordonnées et difficilement attaquables et des zones amorphes plus facilement dégradables. La lignine n'est pas dégradée par voie anaérobie et elle gêne la dégradation de la cellulose. La cellulose est plus ou moins dégradée suivant les traitements qu'elle a préalablement subis et suivant l'espèce bactérienne qui l'utilise.

Ainsi, la cellulose des déjections animales est difficilement dégradée car il s'agit de cellulose non digérée riche en lignine. Par contre, les traitements de la cellulose en papeterie la rendent facilement dégradable. Dans les effluents d'usines qui traitent des végétaux, la dégradabilité varie suivant les procédés de lavage, de pelage, etc...

Une étude d'HALLIWELL et BRYANT (1963) sur trois espèces bactériennes (*Bacteroïdes succinogenes, Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*) a montré que seule *Bacteroïdes succinogenes* était capable de dégrader au même degré la poudre de cellulose moulue et le coton brut, alors que les deux autres espèces dégradaient la poudre de cellulose plus complètement que le coton.

D'une façon plus générale, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose naturelle nécessite la présence de plusieurs enzymes. Les enzymes capables d'attaquer les celluloses partiellement dégradées sont largement répandues chez les bactéries cellulolytiques. Par contre, la ou les enzymes responsables de la dégradation initiale de la cellulose native paraissent avoir une répartition plus restreinte.

La cellulolyse peut être un facteur limitant de la digestion car les sucres provenant de la cellulose sont la source principale d'énergie pour un grand nombre de bactéries productrices d'acide.

La cellulolyse aboutit au cellobiose qui est un dimère et, si celui-ci n'est pas utilisé rapidement, il inhibe les cellulases et leur synthèse.

KOTZE *et al.* (1968) ont montré, grâce à des analyses enzymatiques, que la voie essentielle de dégradation des oses résultant de l'attaque des polymères était celle d'EMBDEN-MEYERHOFF qui aboutit à l'acide pyruvique.

La mise en évidence d'activités enzymatiques spécifiques du cycle des pentoses indique aussi que celui-ci peut intervenir.

Enfin, les mêmes méthodes les ont conduits à affirmer que le cycle de KREBS et le cycle glyoxylique jouaient un rôle dans le métabolisme des bactéries de la digestion.

La formation d'acides gras à partir des glucides a donc vraisemblablement comme origine essentielle la fermentation de l'acide pyruvique résultant de la glycolyse. Les divers types de fermentation possibles de l'acide pyruvique (alcoolique, homolactique, butyrique, mixte, butanediolique, propionique, etc...) peuvent théoriquement conduire à la formation de gaz carbonique, d'hydrogène, d'éthanol et des acides formique, acétique, propionique, butyrique, succinique et lactique. Et l'on pourrait s'attendre à trouver dans les digesteurs les produits énumérés ci-dessus. Or, le plus souvent, l'acide acétique est nettement prépondérant et n'est accompagné que des acides propionique et butyrique, en quantités moindres. L'acide formique est absent ou négligeable, les acides lactique et succinique ainsi que l'éthanol sont absents et l'hydrogène est en quantité négligeable.

Deux explications sont possibles à ce phénomène : ou bien les produits formés sont entièrement et immédiatement utilisés par les bactéries productrices de méthane, ou bien les processus de fermentation sont très modifiés au sein du digesteur où l'on a affaire à une population de bactéries et non à une culture pure. Cette dernière explication semble être la bonne comme nous le verrons plus loin.

a.2. *Les composés azotés*

Les acides aminés, issus des protéines, peuvent donner par leurs mécanismes de dégradation habituels (transamination, désamination, décarboxylation), des acides gras volatils ainsi que du gaz carbonique et de l'ammoniac.

Par exemple, WENG et JERIS (1976) ont étudié la dégradation de l'acide glutamique et ont été conduits à proposer le schéma représenté sur la figure n° 2.

Les acides ramifiés que l'on trouve en petites quantités dans les digesteurs ont pour origine la désamination des acides aminés et non la fermentation des glucides.

Comme les glucides, les acides aminés sont susceptibles de conduire à l'acide pyruvique et donc aux mêmes produits que les oses dégradés par la glycolyse.

Mais surtout, les peptides, les acides aminés et l'ammoniac vont redonner des protéines microbiennes. Ainsi, la perte globale en protéines n'est pas très importante et la proportion des acides gras formés par dégradation des acides aminés est faible.

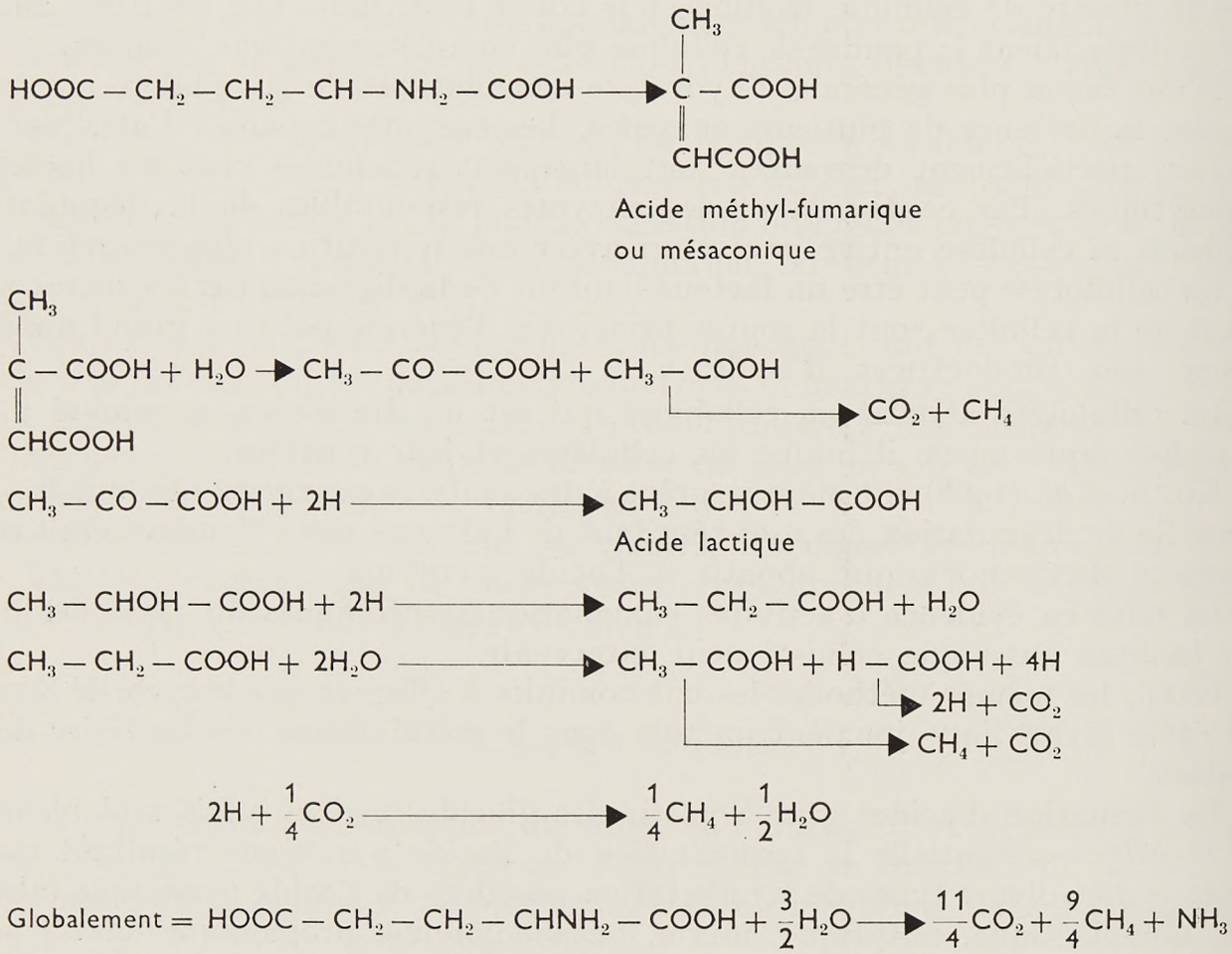


FIG. 2. — *Dégradation de l'acide glutamique* (WENG et JERIS, 1976).

Des composés azotés non protéiques peuvent aussi être à l'origine d'acides gras. Par exemple, *Micrococcus aerogenes, Micrococcus lactilyticus, Clostridium cylindrosporum, Clostridium acidi urici* et plus généralement des bactéries du rumen *in vitro* peuvent former, suivant le cas, les acides formique, acétique, propionique ou lactique à partir de bases puriques ou pyrimidiques.

a.3. *Les lipides*

Les acides gras sont d'abord libérés grâce aux lipases des bactéries qui attaquent les triglycérides et séparent ainsi les acides gras du glycérol qui peut rejoindre

la voie d'EMBDEN-MEYERHOF après phosphorylation et oxydation en dihydroxyacétone phosphate.

Dans le rumen, les acides gras libres constituent en grande partie le produit terminal de la digestion et ils sont absorbés. Dans les digesteurs, au contraire, les acides gras sont dégradés.

Les mécanismes de formation d'acides gras à chaîne courte à partir des acides gras à longue chaîne, sont encore mal connus mais le mécanisme essentiel est vraisemblablement la β-oxydation.

Ainsi, HEUKELEKIAN et MUELLER (1958) constatent dans un digesteur la transformation de l'acide stéarique (C_{18}) en acide palmitique (C_{16}) puis en acide myristique (C_{14}).

Or, la β-oxydation transforme un acide en C_n en un acide en C_{n-2} accompagné d'acide acétique (sous forme d'acétyl CoA) et de 4 H.

JERIS et Mc CARTY (1965) indiquent que les acides palmitique et octanoïque sont dégradés par β-oxydation.

De même, WENG et JERIS (1976) proposent deux mécanismes de dégradation de l'acide oléique où intervient la β-oxydation (fig. 3).

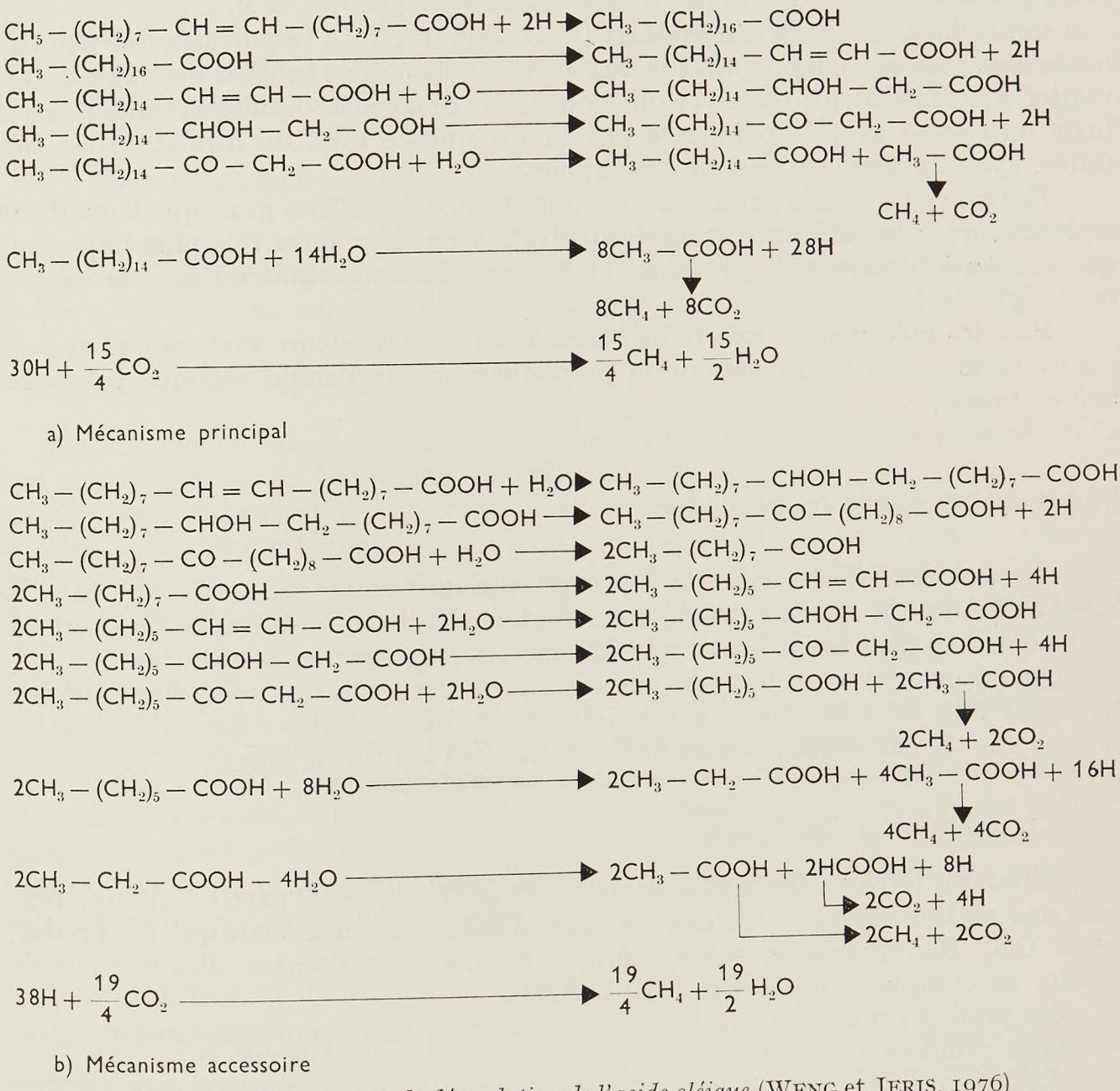


FIG. 3. — *Mécanismes de dégradation de l'acide oléique* (WENG et JERIS, 1976)

— Mécanisme principal : la molécule est saturée puis oxydée (fig. 3*a*).

La réaction globale peut s'écrire :

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH + \frac{17}{2} H_2O \rightarrow \frac{51}{4} CH_4 + \frac{21}{4} CO_2$$

— Mécanisme accessoire : la molécule est oxydée et coupée au niveau de sa double liaison avant intervention de la β-oxydation (fig. 3*b*). Globalement, le bilan est le même que dans le cas précédent.

El-Shafie et Bloodgood (1973) précisent que la dégradation des acides gras ramifiés est plus lente que celle des acides gras linéaires et que les acides caproïque, valérique et butyrique sont dégradés en 6,15 et 18 h, respectivement.

a.4. *Conclusions*

Les glucides, les protides et les lipides peuvent conduire, au cours de la digestion anaérobie, à la formation d'acides gras volatils. Les mécanismes impliqués dans la phase d'acidification dépendent donc de la composition des eaux résiduaires et en particulier des teneurs relatives en glucides, protides et lipides.

Cependant, Chynoweth et Mah (1971) ont montré l'importance particulière des acides gras comme précurseurs de l'acétate : ils notent en effet des taux de formation d'acétate identiques avec une boue brute ou avec les lipides extraits de cette boue ou encore avec le palmitate pur tandis que ce taux de formation est très faible avec la boue privée de ses lipides.

Ils trouvent, et cela prouve aussi l'importance des acides gras, que le méthane se forme, avec le palmitate comme substrat, à un taux onze fois plus important qu'avec un hydrolysat de protéines et 80 fois plus important qu'avec le glucose ou le glycérol.

Mais les mécanismes exacts de l'acidification sont encore mal connus et il en est de même pour les raisons de la prépondérance de l'acide acétique parmi les acides formés.

b) *Microbiologie de l'acidogenèse*

Des travaux comme ceux de Toerien, Siebert et Hattingh (1967), Mah et Susman (1968) ou Kirsch (1969) montrent que les bactéries anaérobies strictes sont beaucoup plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives.

Quand on n'observe pas une prédominance des bactéries anaérobies strictes, cela peut être dû à la présence très importante de bactéries dans l'alimentation comme dans le cas des digesteurs de lisiers étudiés par Shaw (1971).

b.1. *Bactéries cellulolytiques*

Hungate (1950) a isolé des bactéries cellulolytiques à partir d'un digesteur dans une station urbaine. L'étude de deux d'entre elles a montré qu'elles produisaient CO_2, H_2, éthanol et acide acétique et que l'une d'entre elles donnait de l'acide succinique ($HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH$).

Ces produits n'étaient pas les seuls formés car ils ne représentaient que 50 p. 100 de la cellulose dégradée.

Maki (1954), sur un milieu contenant du papier filtre moulu, des sels et 30 p.

100 de boues de digesteur, a trouvé $1,6.10^4$ à $9,7.10^5$ bactéries cellulolytiques par ml.

HARKNESS (1966) a noté la présence de longues chaînes de bactéries gram négatives autour des fibres de papier contenues dans son milieu.

Les bactéries cellulolytiques du rumen sont essentiellement *Bacteroïdes succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Cillobacterium cellulosolvens, Clostridium lochheadii* et *Cellulomonas fimi* (WOOD, 1970).

TOERIEN (1967), au moyen de la culture par enrichissement ,a identifié dans les digesteurs diverses bactéries aérobies ou anaérobies facultatives douées d'une activité cellulolytique. Citons : *Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Alcaligenes faecalis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas riboflavina, Pseudomonas reptilivora* et *Leptospira biflexa.*

b.2. *Bactéries hémicellulolytiques*

Elles ont été trouvées en nombre comparable à celui des bactéries cellulolytiques (10^4 ou plus par ml) dans des digesteurs de lisiers de porcherie. Elles appartiennent surtout à une espèce : *Bacteroïdes ruminicola* qui pourrait également jouer un rôle important dans la production d'ammoniac par désamination des acides aminés (HOBSON et SHAW, 1971).

b.3. *Bactéries amylolytiques*

TOERIEN (1967) a identifié dans les digesteurs divers bâtonnets possédant un pouvoir amylolytique : *Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Micrococcus candidus, Micrococcus varians, Micrococcus urae* et *Pseudomonas sp.*

b.4. *Bactéries protéolytiques*

TOERIEN (1967) ainsi que MC CARTY *et al.* (1962) ont relié l'activité protéolytique à la présence de bâtonnets sporulants.

En 1969, SIEBERT et TOERIEN ont étudié la flore anaérobie d'un digesteur avec un milieu artificiel contenant beaucoup de protéines. Les bactéries protéolytiques reconnaissables par le halo clair autour des colonies étaient au nombre de $6,5.10^7$ par ml. Sur 43 isolées, ont été identifiés 28 *Clostridia*, 3 bacilles non sporulants gram-négatifs, 8 *Peptococcus sp.*, 3 *Bifidobacterium sp.* et une anaérobie facultative : *Staphylococcus sp.*

De même, SHAW (1971), dans un digesteur de lisier de porcherie, trouve que les *Clostridia* sont les bactéries protéolytiques les plus représentées.

Il y a donc une prépondérance des bactéries protéolytiques gram-positives, telles que les *Clostridia* dans les digesteurs, contrairement au rumen où les gram-négatives sont les plus nombreuses. Par contre, les bactéries qui dégradent les glucides sont pour la plupart gram-négatives et semblables à celles du rumen. Ces constatations restent inexpliquées.

b.5. *Bactéries lipolytiques*

Il y a peu d'information à leur sujet jusqu'à présent. Selon TOERIEN (1967), les principales bactéries lipolytiques des digesteurs sont des vibrions appartenant aux genres *Bacillus, Alcaligenes* et *Pseudomonas.*

b.6. *Autres bactéries*

La production de sulfure d'hydrogène peut provenir de bactéries qui fermentent les glucides dans un milieu contenant des acides aminés soufrés mais, dans les digesteurs, on trouve également le genre *Desulfovibrio* qui réduit les sulfates, et en particulier *Desulfovibrio desulfuricans* (TOERIEN, THIEL et HATTINGH, 1968).

Des bactéries utilisent le lactate qui peut se former comme produit intermédiaire de la fermentation des glucides. Ces bactéries peuvent être des *Streptococcus sp.*, des *Bacteroïdes sp.*, des *Clostridia sp.*, et elles produisent surtout les acides acétique et propionique (HOBSON, BOUSFIELD, SUMMERS, 1974).

Enfin des bactéries dénitrifiantes peuvent conduire à un dégagement d'azote dans les digesteurs.

b.7. *Interactions entre bactéries*

Comme on l'observe très souvent dans les populations bactériennes mixtes, des interactions surviennent entre espèces différentes. Et l'on connaît quelques exemples d'interactions chez les bactéries anaérobies (HOBSON, BOUFIELD, SUMMERS, 1974) :

— Le produit de fermentation qu'est l'acétate est utilisé par certaines bactéries du rumen pour la synthèse de constituants cellulaires.

— Des acides gras ramifiés comme les acides isobutyrique, méthyl-2-butyrique, isovalérique constituent les squelettes carbonés nécessaires à la synthèse d'acides aminés par les bactéries cellulolytiques qui utilisent l'ammoniac (*Ruminococcus* par exemple).

— Les acides acétique, propionique, butyrique et valérique sont également incorporés dans les protéines de certaines bactéries.

— Les acides gras ramifiés provenant de la désamination d'acides aminés sont retrouvés dans les acides et aldéhydes ramifiés, à longue chaîne, des lipides bactériens du rumen.

— Chez beaucoup de bactéries, le gaz carbonique produit par d'autres bactéries est utilisé pour former les groupements carboxyliques des acides aminés, pour synthétiser d'autres constituants cellulaires ou encore pour produire l'acide succinique.

— On a montré que l'acide succinique était le précurseur de l'acide glutamique, de la proline et de l'arginine chez *Bacteroïdes ruminicola* et peut-être *Selenomonas ruminantium* (ALLISON, ROBINSON, 1970).

— L'absence d'oxygène rend nécessaire la présence d'un autre accepteur d'électrons. Celui-ci peut parfois être le nitrate ou le sulfate mais, le plus souvent, il s'agit d'un produit de dégradation des glucides (par exemple : pyruvate + $e^- \rightarrow$ lactate) ou bien les ions H^+, grâce à une activité hydrogénase peuvent donner de l'hydrogène. S'il s'accumule, cet hydrogène inhibe les bactéries qui le forment mais il peut être utilisé par d'autres bactéries.

IANNOTI *et al.* (1973) ont étudié le comportement de *Ruminococcus albus* et de *Vibrio succinogenes*. En cultures pures, *Ruminococcus albus* donnait pour 100 moles de glucose fermentées, 69 moles d'éthanol, 74 moles d'acétate, 237 moles d'hydrogène et du gaz carbonique et *V. succinogenes*, en présence de fumarate et d'hydrogène, formait du succinate. En culture mixte, dans un milieu contenant du glucose et du fumarate, les seuls produits formés étaient l'acétate (147 moles) et le succinate (384 moles), chaque mole de succinate correspondant à la production d'une mole d'hydrogène par *R. albus*. La formation accrue d'hydrogène se

faisait aux dépens de l'éthanol et la production d'acétate était donc également plus importante.

D'autres études (CHUNG, 1972) montrent que la production d'acétate par une bactérie productrice d'hydrogène augmente quand celle-ci est en présence d'une bactérie utilisant cet hydrogène.

Dans un digesteur, l'utilisation de l'hydrogène par les bactéries productrices de méthane dirigerait donc la fermentation des glucides vers une production maximale d'hydrogène et d'acide acétique. Inversement, s'il y a surproduction d'hydrogène, les fermentations donneront surtout des acides à plus longue chaîne.

b.8. *Influence des conditions de croissance des bactéries*

La fermentation varie avec les espèces et souches bactériennes mais aussi avec les conditions de croissance des bactéries.

b.81. *Influence de la concentration en substrat et du taux de croissance*

En culture pure, on utilise en général des concentrations importantes de sucres et la croissance bactérienne est stoppée à cause de la diminution du pH avant que la concentration en sucre ne devienne facteur limitant. Par contre, dans les conditions normales de fonctionnement d'un digesteur, le taux de croissance est limité par l'approvisionnement en substrat. Or, si la concentration en substrat affecte le taux de croissance d'une bactérie, elle peut aussi dans certains cas modifier la nature des produits de fermentation. Ainsi, *Selenomonas ruminanticum* cultivé sur un milieu riche en glucose possède un taux de croissance élevé et produit 50 p. 100 d'acide lactique et 50 p. 100 d'acide acétique. Par contre, sur un milieu renfermant de faibles concentrations en glucose, le taux de croissance de la bactérie est moins élevé et les produits de fermentation sont essentiellement les acides acétique et propionique. De même, les cultures continues d'*Anaerovibrio lipolytica*, bactérie lypolytique du rumen, ne produisent de l'acide succinique à partir du glycérol que si le taux de croissance de la bactérie est fort, donc le taux de dilution élevé.

Dans les digesteurs, le facteur limitant de la croissance des bactéries est le plus souvent la source d'énergie plutôt que la teneur en azote.

De plus les glucides des eaux à traiter sont en général des polymères et sont donc rarement utilisables immédiatement. Ce qui limite la croissance bactérienne est donc très fréquemment le taux d'hydrolyse des glucides et non pas leur concentration dans l'eau à traiter. Ainsi, *Butyrivibrio fibrisolvens* dont la croissance est plus faible sur la cellulose que sur le cellobiose donne une proportion d'acide lactique 3 fois plus grande avec le cellobiose qu'avec la cellulose comme substrat. Ceci explique l'absence d'acide lactique dans les digesteurs où les taux de croissance sont faibles.

b.82. *Influence du pH*

Le pH a aussi une action sur le métabolisme des bactéries. Et cette action peut également expliquer la nature des acides produits, compte tenu du fait que le pH des digesteurs est souvent voisin de 7. Par exemple, le pourcentage d'acide lactique produit par une bactérie augmente quand le pH diminue (HOBSON, BOUSFIELD, SUMMERS, 1974). Il en est de même pour la formation d'acide succinique par *Anaerovibrio lipolytica*.

Par contre, *Micrococcus lactilyticus* ne produit de l'acide formique en quantité importante qu'à pH 8,5. A pH 6,5, il n'en produit pas (NOVELLI G. D., 1955).

b.83. *Influence du rapport C/N*

Dans une culture continue d'une bactérie du rumen, HENDERSON, HOBSON et SUMMERS (1969) ont observé que les activités amylolytique et protéolytique étaient beaucoup plus importantes si le facteur limitant était le carbone que si le facteur limitant était l'azote. Dans ce dernier cas, l'azote est incorporé dans des molécules plus indispensables que les enzymes extracellulaires.

Dans un digesteur, la production d'enzymes comme la cellulase par exemple, doit toujours être importante car il y a un risque de destruction des enzymes par des protéases. Il convient donc de ré-équilibrer le rapport C/N dans un milieu riche en sucres.

b.84. *Conclusion*

Les différentes observations qui précèdent ont souvent été faites dans des conditions différentes de celles des digesteurs, mais elles montrent au moins sur quel type d'information on peut se baser pour comprendre la digestion anaérobie. Elles montrent en particulier que le fait de travailler avec une population comprenant de nombreuses espèces dans des conditions physico-chimiques particulières, peut conduire à la formation de produits différents de ceux que l'on obtiendrait avec des cultures pures en milieu classique.

2. — *La méthanogenèse*

a) *Les substrats*

Actuellement, les seuls substrats dont on sait qu'ils peuvent être utilisés directement pour former du méthane par des cultures pures de bactéries sont le gaz carbonique et l'hydrogène, le formate, l'acétate et le méthanol.

Cependant, il existe, sinon des bactéries, du moins des associations symbiotiques de bactéries qui produisent du méthane à partir des acides et des alcools de C_1 à C_5.

De même, la fermentation de l'acide benzoïque, marqué par du ^{14}C, par une culture de bactéries productrices de méthane provenant d'un digesteur (NOTTINGHAM et HUNGATE, 1969) prouve que la dégradation du noyau benzénique est possible par cette voie ($4\ C_6H_6CO_2 + 18\ H_2O \rightarrow 15\ CH_4 + 13\ CO_2$) et il semble d'après cette étude qu'il n'y ait pas d'intermédiaires entre l'acide benzoïque et les deux gaz. Une seule bactérie serait donc en cause dans cette transformation.

Ceci n'a été montré que pour l'acide benzoïque et on ignore si de telles réactions sont possibles avec des noyaux benzéniques engagés dans des molécules complexes ou supportant d'autres chaînes ou groupements fonctionnels (lignine, composés polyphénoliques).

Les substrats essentiels possibles pour la méthanogenèse dans les digesteurs sont l'acétate et le gaz carbonique.

D'une façon très schématique et globale, les hexoses qui subissent la glycolyse conduisent à la formation de méthane dont 2/3 proviennent de l'acétate dérivé de l'acide pyruvique, et 1/3 de la réduction du gaz carbonique par l'hydrogène.

De même, la dégradation des acides gras fournit 4 atomes d'hydrogène pour une molécule d'acétate et là encore 2/3 du méthane proviendraient de l'acétate.

Effectivement, SMITH et MAH (1966) ont observé, grâce à l'emploi d'éléments marqués, que 73 p. 100 du méthane avaient l'acétate pour précurseur.

b) *Mécanisme*

BARKER, en 1956, a proposé un schéma faisant intervenir un transporteur X du carbone que l'on retrouve dans le méthane. Quel que soit le substrat, la transformation passe par le stade X-CH_3 (fig. 4).

Certains résultats expérimentaux (BLAYLOCK, 1968; BRYANT, Mc BRIDE et WOLFE, 1968) font penser que l'acide tétrahydrofolique et la vitamine B_{12} pourraient être des transporteurs possibles mais leur rôle exact dans la méthanogenèse n'a pas encore été élucidé.

L'étude de la partie terminale du schéma de BARKER (X-CH_3 → CH_4) a permis la découverte du coenzyme M qui, jusqu'alors, n'a été détecté que chez des

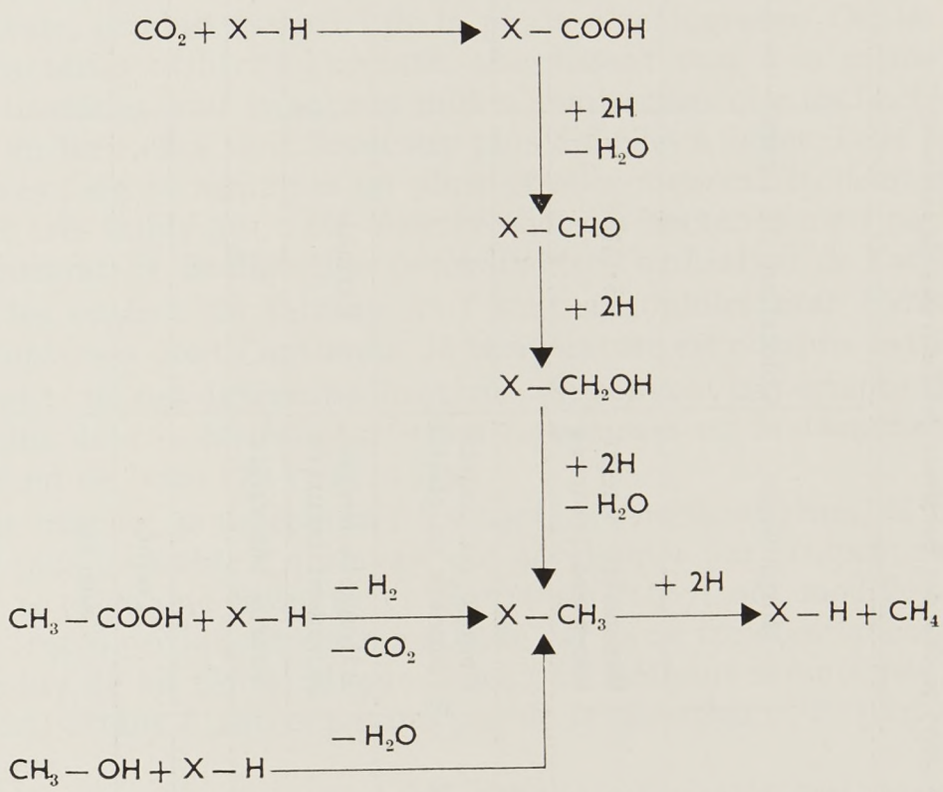


FIG. 4. — *Hypothèse de Barker* (1956) *sur le mécanisme de formation du méthane.*

bactéries productrices de méthane, dans les eaux et dans le rumen (Mc BRIDE et WOLFE, 1977).

La structure chimique de ce coenzyme est connue ($HS\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3^{--}$) et on pense qu'il agit comme transporteur du groupement méthyl (TAYLOR et WOLFE, 1974). Il peut accepter le groupement méthyl de la méthyl-cobalamine (B_{12}) et l'enzyme qui catalyse cette réaction, la méthylcobalamine — coenzyme M — méthyl-transférase, a été purifiée à partir de *Methanobacterium M.O.H.*

En résumé, les mécanismes impliqués dans la méthanogenèse sont encore en grande partie inconnus. Le schéma proposé par BARKER, il y a plus de 20 ans, n'a pas encore été établi. Le rôle exact de l'A.T.P. qui est nécessaire à la formation du méthane n'est pas élucidé.

c) *Microbiologie*

La croissance des bactéries productrices de méthane dépend de celle des bactéries de la phase d'acidification : celles-ci leur fournissent de l'ammoniac qui est

TABLEAU I

Quelques caractéristiques des bactéries productrices de méthane

Bactéries	Substrats	Morphologie	Coloration de Gram	Besoins nutritionnels	
				Azote	Autres
Methanobacterium M.O.H.	$H_2 + CO_2$	Bâtonnets irrégulièrement incurvés	Variable	NH_3	Acétate comme stimulant
Methanobacterium thermoautotrophicum	$H_2 + CO_2$	?	?	?	?
Methanobacterium ruminantium . .	$H_2 + CO_2$ ou HCOOH	Coques ou courts bâtonnets en chaîne	+	NH_3	Acétate (méthyl-2-butyrate suivant la souche)
Methanobacterium formicicum . . .	«	Bâtonnets irrégulièrement incurvés	Variable	NH_3	?
Methanobacterium mobile	«	Courts bâtonnets	—	NH_3	?
Methanospirillum hungati	«	?	?	?	?
Methanococcus vannielii	«	Coques	?	NH_3	Aucun
Methanosarcina barkeri	$H_2 + CO_2$ CH_3OH CH_3COOH	Sarcina	+	NH_3	Aucun
Methanobacterium arbophilicum . . .	$H_2 + CO_2$	Bâtonnets courts	?	NH_3	

la principale, et peut-être la seule source d'azote utilisable par les bactéries productrices de méthane.

En 1975, d'après TAYLOR, on ne connaissait, de façon certaine, que 8 bactéries capables de produire du méthane en culture pure (voir tabl. 1). En 1977, ZEIKUS cite une autre bactérie : *Methanobacterium arbophilicum*. On avait longtemps cru connaître un nombre plus important de bactéries mais la pureté des cultures a été mise en doute après que l'on ait découvert que *Methanobacillus omelianskii*, qui avait été décrite comme une espèce pure, était en réalité l'association symbiotique de 2 bactéries, dont l'une transformait l'éthanol en hydrogène et acétate et l'autre réduisait le gaz carbonique atmosphérique en méthane, grâce à l'hydrogène (BRYANT *et al.*, 1967).

Une seule bactérie (*Methanosarcina barkeri*) semble capable d'utiliser directement l'acétate, produit essentiel de la phase d'acidogenèse. Or, les essais d'isolement de bactéries utilisant l'acétate, aboutissent tous à la même conclusion : ou bien ces bactéries sont beaucoup moins nombreuses que les bactéries utilisant l'hydrogène ou bien elles sont beaucoup plus difficiles à isoler. Leur temps d'incubation est très long (8 semaines ou plus) et elles meurent facilement. Si le taux de croissance très faible qui a été observé chez ces bactéries n'est pas un artefact, le facteur limitant de la digestion pourrait être l'utilisation de l'acétate.

Toutes les espèces du tableau n° 1 sont mésophiles sauf *Methanobacterium thermoautotrophicum* dont l'optimum de température est compris entre 65 et 70 °C.

La quantité de ces différentes bactéries est souvent importante. Par exemple, on trouve plus de 10^7 *Methanobacterium formicicum* ou *Methanobacterium ruminantium* par ml de boue (TAYLOR, 1975).

On peut utiliser, pour compter les bactéries méthanogènes, la technique du « nombre le plus probable » qui avait été développée par HEUKELEKIAN et HEINEMANN en 1939 et que SIEBERT et HATTINGH (1967) ont modifiée. Cependant, THIEL *et al.* (1968) critiquent cette méthode car ils ne trouvent aucune corrélation entre le nombre de bactéries qui produisent du méthane mesuré par cette voie et un nombre important d'autres paramètres de la digestion et en particulier la production de gaz.

Certaines bactéries ont des besoins nutritionnels précis. Par exemple, la croissance d'une souche du rumen de *Methanobacterium ruminantium* nécessite des facteurs de croissance présents dans le rumen (BRYANT *et al.* 1971). Ces facteurs de croissance peuvent être séparés en 2 parties par acidification et extraction à l'éther. L'une n'est pas extractible à l'éther et n'a pas été identifiée et l'autre est constituée par des acides organiques. Deux acides sont nécessaires à la croissance de la bactérie : l'acide acétique en teneur relativement élevée et l'acide méthyl-2-butyrique en teneur relativement faible. Environ 60 p. 100 du carbone cellulaire provient de l'acide acétique et l'acide méthyl-2-butyrique permet la synthèse de l'isoleucine selon la réaction globale :

$$CH_3-CH_2-\underset{}{\overset{CH_3}{\overset{|}{CH}}}-COOH + CO_2 + 4H + NH_3 \rightarrow$$

$$CH_3-CH_2-\overset{CH_3}{\overset{|}{CH}}-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + 2\ H_2O$$

La concentration active du facteur non extractible à l'éther montre qu'il agirait plutôt comme catalyseur que comme substrat, et des études suggèrent qu'il serait identique au coenzyme nécessaire au transfert du groupement méthyl au cours de la formation du méthane à partir du gaz carbonique ou de la méthylcobalamine chez *Methanobacterium M.O.H.*

L'ammoniac est également indispensable à la croissance de *M. ruminantium* qui l'utilise comme source principale d'azote. Une autre souche de *M. ruminantium*, que l'on trouve dans les eaux d'égout, a à peu près les mêmes besoins mais l'acide méthyl-2-butyrique n'est pas indispensable. Par contre une ou plusieurs vitamines B lui sont nécessaires.

3. — *Caractérisation et contrôle de la digestion*

Des considérations théoriques précédentes, il ressort que les mécanismes biochimiques de la digestion sont encore en partie inconnus. Or, dans la pratique, on constate que la digestion est un phénomène lent dont le fonctionnement est sujet à des défaillances relativement fréquentes. Il apparaît donc indispensable de trouver d'une part, des paramètres capables de rendre compte fidèlement du fonctionnement d'un digesteur et, d'autre part, les paramètres sur lesquels il faut agir pour contrôler la digestion. Les différents aspects de ce problème ont été rassemblés et discutés par KOTZE, THIEL et HATTINGH (1969).

THIEL *et al.* (1968) ont mesuré un nombre important de caractéristiques, en particulier les activités enzymatiques, sur trois digesteurs expérimentaux et étudié les corrélations entre ces caractéristiques. Les grandeurs corrélées le plus significativement avec les autres sont la production totale de gaz, le pourcentage de méthane dans le gaz, l'alcalinité, la teneur en acides gras volatils, les matières en suspension, le nombre d'anaérobies et les activités enzymatiques en général. Il semble donc que ces paramètres soient parmi ceux qui reflètent le mieux l'activité des digesteurs.

Etant donné les exigences des bactéries, il est très important de maintenir le pH au voisinage de la neutralité. A pH 6 ou pH 8, la digestion est très compromise. Le pH est lié à la teneur en acides volatils et à l'alcalinité du milieu surtout due au bicarbonate

$$\left(H^+ = k_1 \frac{H_2CO_3}{HCO_3^-}\right)$$

Si la concentration des acides volatils augmente trop, l'effet tampon du bicarbonate peut être insuffisant pour maintenir un pH assez élevé. Il faut alors contrôler le pH de l'extérieur en augmentant la teneur en bicarbonate. Le plus souvent, on le fait en ajoutant de la chaux qui, avec le gaz carbonique, forme du bicarbonate. Mais la chaux, au-dessus de pH 6,7-6,8, conduit à la formation de carbonate insoluble en se combinant au gaz carbonique. De plus, elle provoque une dépression en réagissant avec le gaz carbonique (MAC CARTY, 1964*a*). Le bicarbonate de sodium est donc préférable pour le contrôle du pH.

Un autre facteur relié à un nombre important de paramètres (teneur en microorganismes, matières en suspension, activités enzymatiques...) et qui peut être contrôlé facilement, est la charge massique, c'est-à-dire la quantité de substrat apporté par unité de temps et par unité de masse de bactéries. Le débit d'entrée, le volume du digesteur, le taux de recyclage des boues peuvent être ajustés pour obtenir la charge massique la plus favorable.

4. — *Inhibition et stimulation de la digestion*

a) *Inhibition*

La lenteur de la digestion anaérobie a des raisons intrinsèques sur lesquelles il est difficile d'agir. Par exemple, la dégradation de la cellulose, la phase de formation du méthane en général ou encore le passage des produits de la phase liquide à la phase gazeuse peuvent être les facteurs limitants de la digestion (FINNEY et EVANS, 1975). Mais elle peut aussi être ralentie ou même arrêtée par la présence d'inhibiteurs dans l'alimentation. Remarquons qu'un arrêt de la digestion s'accompagne d'une augmentation de la concentration en acides gras volatils (MAC CARTY, 1963*a*). Cependant cette accumulation est la conséquence et non la cause de l'inhibition de la méthanogenèse. En effet, HOBSON et SHAW (1975) ont montré que les acides acétique et butyrique ne diminuaient pas la production de méthane chez *Methanobacterium formicicum*, même à des concentrations de 10 g/l. L'acide propionique, par contre, ralentit la méthanogenèse lorsqu'il est présent à des teneurs supérieures à 1 g/l. Mais dans la pratique, il est difficile d'attribuer à l'accumulation d'acide propionique la responsabilité d'un arrêt de la méthanogenèse, car une inhibition de l'utilisation de l'hydrogène par une cause toute autre que l'accumulation d'acides volatils, peut conduire à la synthèse d'acide propionique à la place d'acide acétique (HOBSON, BOUSFIELD et SUMMERS, 1974).

a.1. *Cations alcalins et alcalino-terreux, ammoniac, sulfures* (MAC CARTY, 1964*b*)

— Les ions Na^+, K^+, Ca^{++}, et Mg^{++} stimulent la digestion à basse concentration mais l'inhibent à des concentrations élevées. S'ils agissent ensemble, ces cations sont soit antagonistes soit synergiques.

— A haute concentration (3 000 mg/l ou plus), l'azote ammoniacal, indépendamment du pH, est toxique.

— Au-dessus de 200 mg/l en solution, les sulfures sont très toxiques.

a.2. *Métaux lourds*

Ils provoquent des accidents de digestion lorsque leur concentration dépasse un certain seuil.

Au sein du digesteur, il existe des mécanismes de protection contre les métaux lourds :

— Précipitation de sulfures. Ce mécanisme n'intervient pas pour le chrome.

— Précipitation de carbonates si le pH est suffisamment élevé (7,2 pour le cadmium par exemple). Ce mécanisme est surtout important pour le fer dont le carbonate précipite si le pH est supérieur à 6,4, ce qui peut permettre une libération par le sulfure de fer, d'ions S^{--} alors disponibles pour les autres métaux.

— Réduction des métaux à une valence inférieure, ce qui réduit les besoins en ions sulfures.

Puisque les agents qui neutralisent les ions métalliques réagissent de façon stoechiométrique avec tous les métaux lourds courants (à l'exception du chrome), il a été proposé (MOSEY, 1976) d'exprimer la toxicité des métaux lourds par la formule :

$$k = \frac{\text{Fe}/27{,}9 + \text{Zn}/32{,}7 + \text{Ni}/29{,}4 + \text{Pb}/103{,}6 + \text{Cd}/56{,}2 + 0{,}67\ \text{Cu}/31{,}8}{\text{Concentration en matière sèche}}$$

où 27,9 — 32,7 — 29,4 — etc... sont les poids équivalents quand les métaux sont sous forme divalente et 0,67 est un facteur permettant de tenir compte de la réduction partielle du cuivre en cuivre cuivreux.

Fe, Zn, Ni etc... sont exprimés en mg/l, la concentration en matière sèche en kg/l et k en meq/kg.

Si le pH est supérieur à 6,4 ce qui est, en principe, le cas dans un digesteur, le terme Fe/27,9 peut être supprimé, le fer étant précipité.

Des résultats expérimentaux montrent que k peut servir à prévoir de façon acceptable la toxicité des métaux. Il semble, par exemple, que lorsque k dépasse 200 meq/kg la digestion soit perturbée.

Le chrome agit différemment des autres métaux et sa toxicité est fonction de sa concentration totale. Les concentrations dépassant 2,5 p. 100 de la matière sèche dans le digesteur, peuvent être considérées comme inhibitrices.

a.3. *Analogues du méthane*

On a utilisé expérimentalement des analogues du méthane pour inhiber la méthanogenèse (Thiel, 1969) et mettre en évidence les précurseurs du méthane. Ainsi, de très basses concentrations de chloroforme, de tétrachlorure de carbone ou de chlorure de méthylène inhibent la méthanogenèse.

b) *Stimulation*

L'addition d'un mélange d'acides aminés ou d'une culture de bactéries productrices de méthane préalablement tuées stimule l'utilisation de l'acide acétique par des bactéries du méthane issues d'un digesteur (Novak et Ramesh, 1975). Par ailleurs, un composé est mieux utilisé s'il est incorporé dans un mélange complexe que s'il est seul dans l'alimentation du digesteur.

II. — Les différents procédés

Depuis que le principe de la digestion anaérobie a été appliqué pour la première fois, les techniques d'utilisation de ce moyen d'épuration ont évolué. C'est pourquoi il existe actuellement plusieurs procédés d'application possibles pour la digestion.

1. — *Procédé conventionnel* (fig. 5)

L'alimentation est intermittente et le contenu du digesteur n'est ni chauffé, ni mélangé.

Ce système ne permet pas de contrôler la température, l'équilibre biologique, le pH, le contact entre substrat et bactéries.

Toutefois, ses performances peuvent être bonnes si le temps de séjour atteint 30 à 60 jours et si la charge reste assez faible.

2. — *Digesteurs à mélange complet* (fig. 6)

Le contenu du digesteur est chauffé, le plus souvent à 35 °C (digestion mésophile) et parfois à 55 °C (digestion thermophile). Une recirculation de gaz ou un agitateur mécanique homogénéise le milieu.

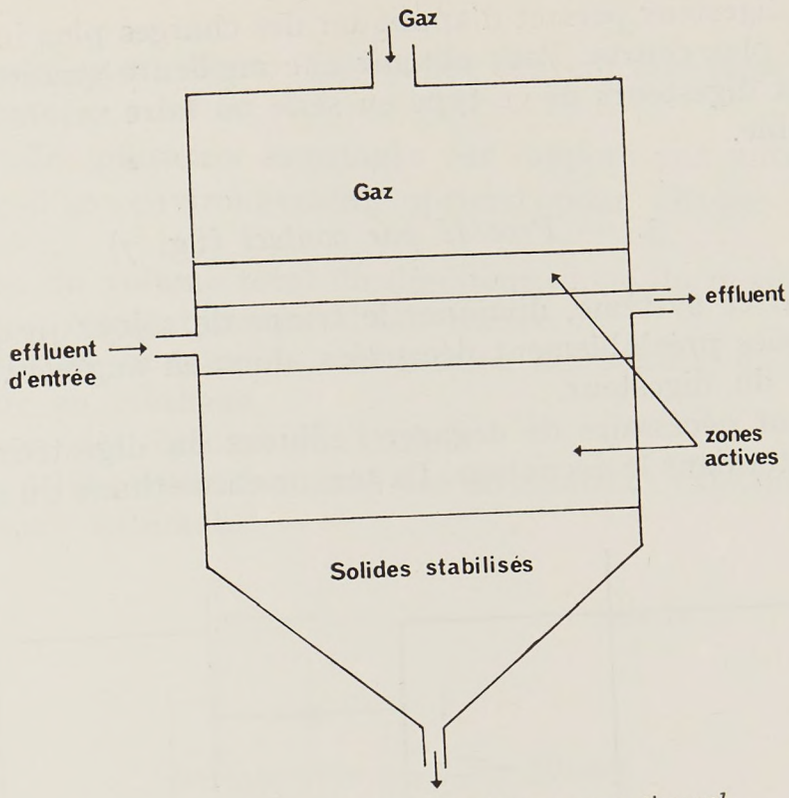


FIG. 5. — *Schéma d'un digesteur conventionnel.*

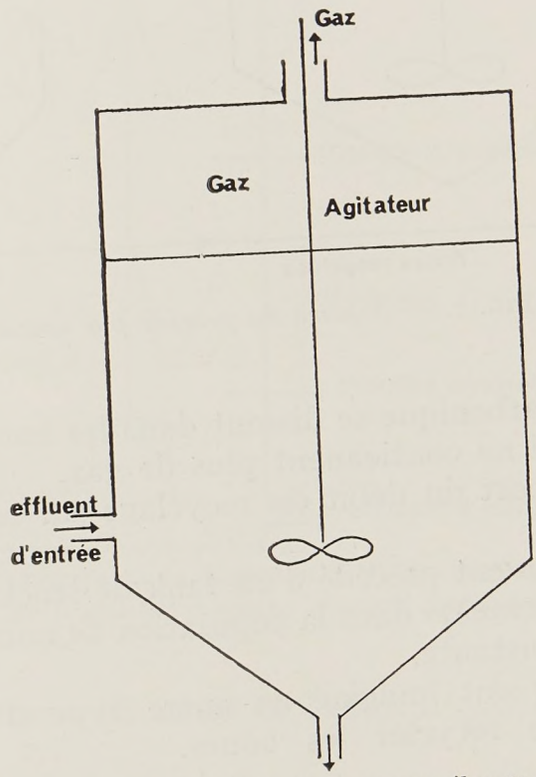


FIG. 6. — *Schéma d'un digesteur en mélange complet.*

Le contrôle des différents paramètres est facilité car les réactions biochimiques, les relations entre les différentes bactéries d'une part et les bactéries et le substrat d'autre part, sont identiques à tous les niveaux du digesteur.

L'alimentation peut être continue ou intermittente et il n'y a pas de séparation de solides.

Les temps de séjour sont souvent de 10 à 30 jours avec un minimum de 3 à 5 jours (ECKENFELDER, 1966).

Ce type de digesteur permet d'appliquer des charges plus importantes ou des temps de séjour plus courts. Pour obtenir une meilleure qualité de l'effluent, on peut placer deux digesteurs de ce type en série ou faire suivre la digestion d'un traitement aérobie.

3. — *Procédé par contact* (fig. 7)

On peut, par ce système, diminuer le temps de séjour jusqu'à 6 à 12 h en recyclant des boues préalablement décantées, donc en augmentant la teneur en microorganismes du digesteur.

Il est souvent nécessaire de dégazer l'effluent du digesteur pour empêcher les solides de flotter dans le décanteur. La teneur en méthane du gaz est alors plus

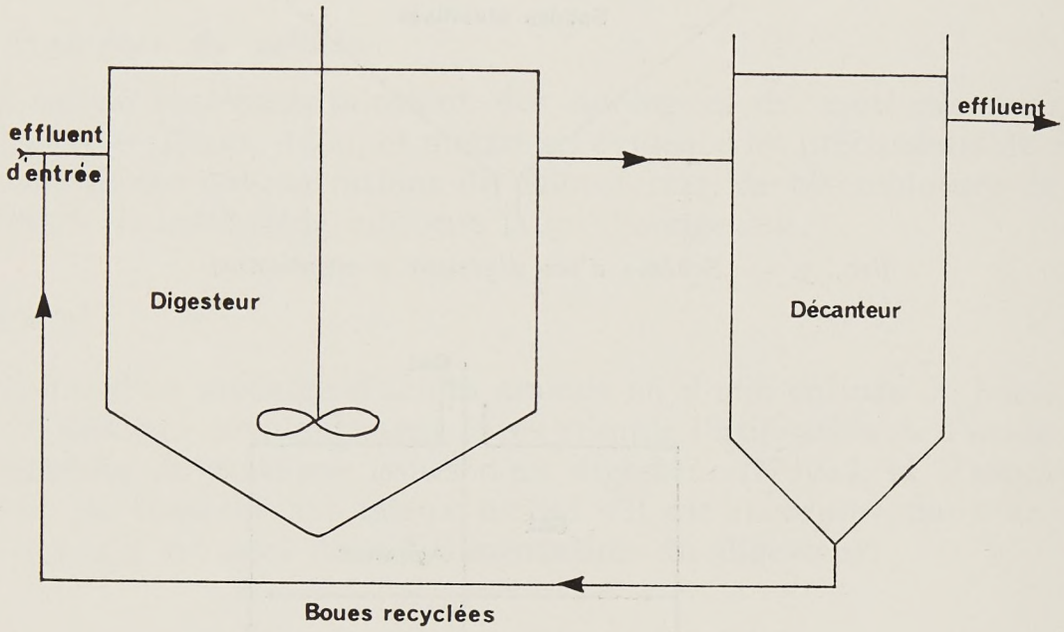


FIG. 7. — *Schéma du procédé par contact.*

importante car le gaz carbonique se dissout dans les boues recyclées qui arrivent dans le digesteur et qui ne contiennent plus de gaz.

En général, le rapport du débit du recyclage sur le débit de l'alimentation varie de 1 à 3.

Le digesteur est souvent précédé d'un tank de stockage des eaux résiduaires pour éviter les bouleversements dans la population de microorganismes en rendant l'alimentation plus constante.

GATES *et al.* (1967) ont imaginé un autre type d'appareil, représenté en figure 8, permettant de recycler les boues.

4. — *Procédé à deux étapes*

Dans les procédés indiqués ci-dessus, les deux populations de bactéries (productrices d'acide et productrices de méthane) sont placées dans les mêmes conditions alors que leurs exigences pour une croissance optimale sont différentes. Elles ne peuvent donc atteindre simultanément leur potentiel métabolique. On a donc imaginé un système à deux étapes où les deux phases biochimiques ont lieu dans deux digesteurs différents en série alimentés en continu (GHOSH, CONRAD et KLASS,

1975; POHLAND et GHOSH, 1971). Les boues peuvent être recyclées dans chacun des deux digesteurs.

Ce procédé offre plusieurs avantages par rapport aux autres :

— Maintien d'un environnement optimal pour chaque type de micro-organismes.

— Réduction du volume total du digesteur, donc du montant des investissements, pour une même quantité d'eau traitée.

— Augmentation du taux de stabilisation des solides, de la production de gaz, de la teneur en méthane.

— Diminution des besoins en chaleur.

— Aptitude à l'incorporation dans des installations existantes avec un capital d'investissement minimal.

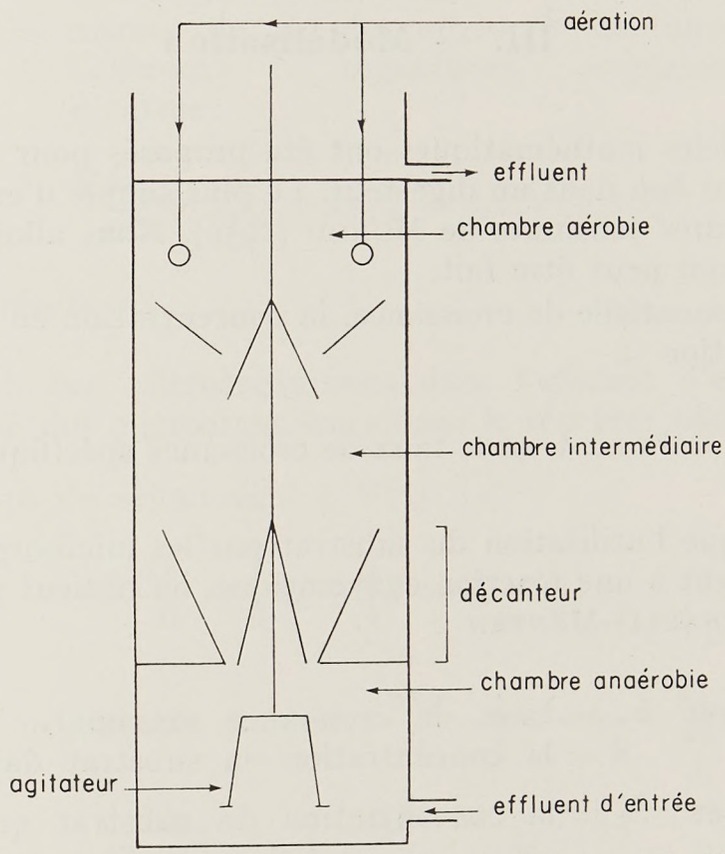


FIG. 8. — *Appareil mixte de laboratoire où la digestion de l'effluent et la décantation des boues ont lieu dans la même enceinte (l'effluent à traiter traverse l'appareil de bas en haut).*

— Réduction de la teneur en azote de l'effluent par dénitrification dans le digesteur acide.

La seule méthode à retenir, actuellement, pour séparer les deux phases, repose sur un contrôle cinétique de chaque phase, qui consiste à régler le taux de dilution et éventuellement le taux de recyclage. En effet, les bactéries du méthane ont un temps de génération (5 h) dix fois plus fort que celui des bactéries « acidifiantes » (GHOSH et POHLAND, 1974); on favorise donc leur élimination, par lessivage, du premier digesteur en appliquant à celui-ci un taux de dilution élevé c'est-à-dire un temps de séjour faible. Par contre, les bactéries du méthane peuvent se développer dans le deuxième digesteur où le temps de séjour est beaucoup plus long et où elles reçoivent un substrat adapté à leur besoin; les bactéries « acidifiantes » ne se développeront pas dans la mesure où les substrats qu'elles utilisent ont été totalement transformés dans le premier digesteur.

5. — *Filtre anaérobie*

L'eau à épurer passe sur la surface de solides inertes qui retiennent les bactéries anaérobies et maintiennent ainsi une concentration importante en bactéries comme le recyclage dans un digesteur.

Ce procédé est applicable à des eaux résiduaires contenant des matières organiques très solubles qui donnent souvent des boues peu décantables.

Pour une même charge organique, le rendement d'épuration augmente avec la concentration en DCO de l'effluent d'entrée (YOUNG et MAC CARTY, 1967).

III. — Modélisation

Plusieurs modèles mathématiques ont été proposés pour rendre compte des phénomènes qui ont lieu dans un digesteur. Le plus simple d'entre eux repose sur la théorie des cultures continues de MONOD (1950). Nous allons voir à son sujet le type de calcul qui peut être fait.

En phase exponentielle de croissance, la concentration en microorganismes x satisfait à l'équation :

$$\frac{dx}{dt} = kx \text{ où } k \text{ est le taux de croissance spécifique.}$$

Si on admet que l'utilisation du substrat par les microorganismes peut être assimilée globalement à une réaction enzymatique, on obtient pour k une expression du type MICHAELIS-MENTEN :

$$k = \frac{k_m S}{S_k + S} \text{ avec } k_m = \text{taux de croissance maximal,}$$

S = la concentration en substrat dans le digesteur,

et S_k = la concentration du substrat quand :

$$k = \frac{k_m}{2}$$

Des tracés expérimentaux de k en fonction de S sont compatibles avec ce type de relation.

Il faut aussi prendre en compte l'autolyse des microorganismes.

$$\frac{dx}{dt} = (k - k_d)x \quad \text{avec} \quad k_d = \text{taux d'autolyse.}$$

Soit R, le rendement égal au rapport de la biomasse produite sur la masse de substrat utilisé.

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{R\,dS}{dt} \quad \text{ou} \quad -R = \frac{dx}{dS}.$$

1. — *Application du modèle mathématique à un digesteur à mélange complet*

On suppose que :

— Une fraction constante des microorganismes est viable.
— Le substrat principal est le substrat limitant.
— L'équation de MONOD est applicable.
— R est constant.
— Il n'y a pas d'inhibiteur.

Puis, on écrit les équations traduisant les variations de la quantité de microorganismes et de la quantité de substrat dans le réacteur :

Varation de la quantité de microorganismes dans le réacteur	=	Microorganismes de l'effluent d'entrée	+	Croissance des microorganismes	—	Autolyse des microorganismes	—	Microorganismes de l'effluent

ou
$$\frac{V dx_1}{dt} = x_0 Q + k x_1 V - k_d x_1 V - x_1 Q \qquad (1)$$

V = Volume du réacteur.
Q = Débit.
x_0 = Concentration des microorganismes dans l'effluent d'entrée.
x_1 = Concentration des microorganismes dans le réacteur (donc dans l'effluent).

Soit θ le temps de séjour égal à V/Q :

(1)
$$\Rightarrow \frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{\theta} x_0 + \left(k - k_d - \frac{1}{\theta}\right) x_1$$

— Souvent x_0 est négligeable et alors : $\frac{dx_1}{dt} = \left(k - k_d - \frac{1}{\theta}\right) x_1$.

$$\Rightarrow \frac{dx_1}{dt} = x_1 \left[\frac{k_m S_1}{S_k + S_1} - k_d - \frac{1}{\theta}\right]$$

A l'équilibre $\frac{dx_1}{dt} = 0 \Rightarrow k - k_d = \frac{1}{\theta}$.

De même pour le substrat, on peut écrire :

Variation de la quantité de substrat du réacteur	=	Substrat de l'effluent d'entrée	—	Substrat consommé	—	Substrat de l'effluent

$\frac{V dS_1}{dt} = QS_0 - \frac{k x_1 V}{R} - QS_1$, S_0 et S_1 étant respectivement les concentrations du substrat dans l'effluent d'entrée et dans le digesteur

$$\frac{Q}{V} = \frac{1}{\theta} \Rightarrow \frac{dS_1}{dt} = \frac{1}{\theta}(S_0 - S_1) - \frac{k x_1}{R}$$

A l'équilibre $k = \frac{1}{\theta} + k_d$ et $\frac{dS_1}{dt} = 0$

donc
$$\frac{1}{\theta}\left(S_0 - S_1 - \frac{x_1}{R}\right) - \frac{k_d x_1}{R} = 0$$
$$\Rightarrow x_1 = \frac{R(S_0 - S_1)}{1 + k_d\theta}$$

On a aussi $\frac{k_m S_1}{S_k + S_1} = k_d + \frac{1}{\theta} \Rightarrow S_1 = \frac{S_k(1 + k_d)}{k_m - (1 + \theta k_d)}$

On peut obtenir expérimentalement les valeurs des constantes k_m, k_d, S_k et R pour toute valeur de θ ou S_0 en utilisant sous d'autres formes les formules précédentes :

$$\frac{S_0 - S_1}{x_1} = \frac{k_d}{R}\theta + \frac{1}{R} \quad \text{donne} \quad R \text{ et } k_d$$

et
$$\frac{\theta}{1 + \theta k_d} = \frac{S_k}{k_m}\frac{1}{S_1} + \frac{1}{k_m} \quad \text{donne} \quad S_k \text{ et } k_m$$

Pour qu'un état d'équilibre puisse être atteint, il faut au départ que

$$\frac{1}{\theta} \leqslant k - k_d$$

ou
$$\frac{1}{\theta} \leqslant \frac{k_m S_1}{S_1 + S_k} - k_d$$

Si le taux de dilution $\frac{1}{\theta}$ est supérieur au taux de croissance global $k - k_d$, les bactéries sont progressivement éliminées du système avec l'effluent.

2. — *Application du modèle au procédé « par contact »* (GATES *et al.*, *1967*)

Il faut, dans ce cas, tenir compte du recyclage des boues.
On a :

Variation de la quantité de bactéries dans le réacteur	=	Bactéries de l'effluent d'entrée	+	Croissance	—	Autolyse	— Bactéries qui ne seront pas recyclées

On peut souvent négliger les bactéries de l'effluent d'entrée, donc :

$$\frac{V dx_1}{dt} = kx_1 V - k_d x_1 V - Q x_w \text{ avec } x_w = \frac{\text{Masse de bactéries quittant le système}}{\text{Volume total quittant le système}}.$$

$$\Rightarrow \frac{dx_1}{dt} = kx_1 - k_d x_1 - \frac{Q}{V}\frac{x_w}{x_1}x_1$$

$$\Rightarrow \frac{dx_1}{dt} = \left(k - k_d - \frac{C_0}{\theta'}\right)x_1 \text{ en faisant } \frac{x_w}{x_1} = C_0, \text{ facteur de recyclage.}$$

Et on a toujours $$\frac{V dS_1}{dt} = QS_0 - \frac{kx_1 V}{R} - QS_1$$

A l'équilibre $$\frac{k_m S_1}{S_1 + S_k} = k_d + \frac{C_0}{\theta'} \Rightarrow S_1 = \frac{S_k(C_0 + \theta' k_d)}{\theta' k_m - (C_0 + \theta' k_d)}$$

et $$\frac{S_0}{\theta'} - \left(k_d + \frac{C_0}{\theta'}\right)\frac{x_1}{R} - \frac{S_1}{\theta'} = 0$$

$$\Rightarrow x_1 = \frac{(S_0 - S_1)R}{\theta' k_d + C_0}$$

Remarque : Dans ce cas θ' est seulement le rapport du volume du digesteur sur le débit Q de l'effluent d'entrée sans tenir compte du recyclage.

On peut imaginer une modification de ce modèle en prenant $\theta = \frac{V}{Q_t}$ comme paramètre, ce qui approche mieux le temps réel d'action des bactéries sur le substrat.

Q_t est le débit de l'effluent de sortie du digesteur.

Soient Q' le débit du recyclage,

x_2 la concentration en microorganismes du recyclage,

et $$r = \frac{Q'}{Q_t} Q_t = Q + Q'$$

On a $$\frac{V dx_1}{dt} = kx_1 V - k_d x_1 V - Q_t x_1 + Q' x_2$$

$$= kx_1 V - k_d x_1 V - Q_t x_1 + rQ_t \frac{x_2}{x_1} x_1$$

$$\Rightarrow \frac{dx_1}{dt} = \left[k - k_d - \frac{1}{\theta}\left(1 - \frac{rx_2}{x_1}\right)\right] x_1$$

En appelant W la différence $1 - \frac{rx_2}{x_1}$ on obtient : $\frac{dx_1}{dt} = \left(k - k_d - \frac{W}{\theta}\right) x_1$

W varie comme C_0 : $\begin{cases} W = 0 \text{ quand toutes les boues sont recyclées} \\ W = 1 \text{ quand il n'y a pas de recyclage} \end{cases}$

$$\frac{V dS_1}{dt} = QS_0 - \frac{kx_1 V}{R} - Q_t S_1 + Q' S_1$$

$$\Rightarrow \frac{dS_1}{dt} = \frac{(1 - r)S_0}{\theta} - \frac{kx_1}{R} - \frac{S_1}{\theta} + \frac{rS_1}{\theta}$$

$$= \frac{(1 - r)(S_0 - S_1)}{\theta} - \frac{kx_1}{R}$$

A l'équilibre $$S_1 = \frac{S_k(W + k_d\theta)}{\theta k_m - (W + \theta k_d)}$$

$$x_1 = \frac{(1 - r)\,(S_0 - S_1)R}{\theta k_d + W}$$

Quand θ augmente, S_1 approche de $\frac{S_k k_d}{k_m - k_d}$

Pour un recyclage total (C_0 ou $W = 0$) : $k = k_d$ et $S_1 = \frac{S_k k_d}{k_m - k_d}$

La qualité de l'effluent est donc indépendante du temps de séjour pour un recyclage total.

Pour avoir, dans deux situations différentes, la même qualité d'effluent, il faut que le rapport des temps de séjour soit égal au rapport des taux de recyclage.

Les constantes sont obtenues expérimentalement comme dans le cas précédent.

Dans le cas où on a affaire à un substrat décantable, et si on tient compte des pertes par échantillonnage et purge de boues, les équations sont modifiées (fig. 9).

$$\frac{V dS_1}{dt} = QS_0 - \frac{k x_1 V}{R} - (1 + s)QS_1 + sQS_s$$

s est la fraction recyclée du débit Q.

S_s est la concentration du substrat décantable dans le recyclage.

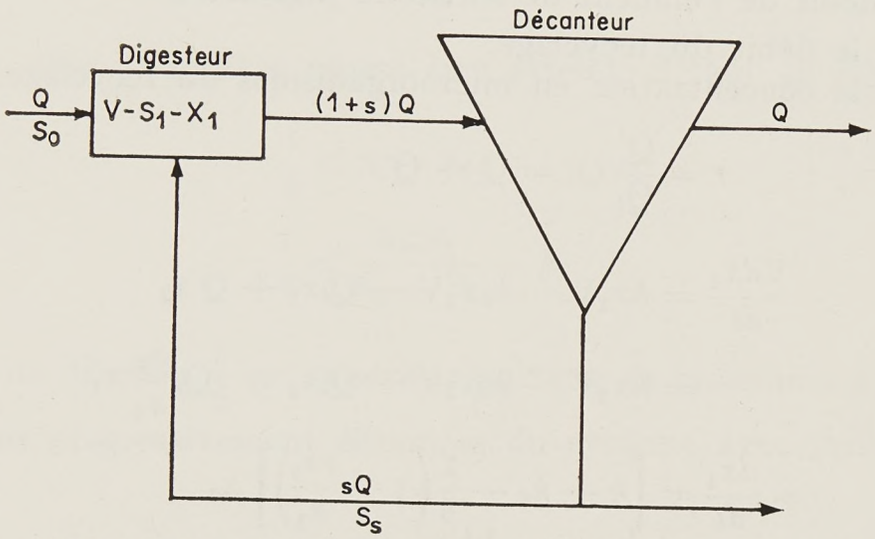


FIG. 9. — *Schéma récapitulatif des paramètres utilisés pour modéliser le procédé par contact avec un substrat décantable.*

A l'équilibre :

$$QS_0 - \frac{k_d x_1 V}{R} - \frac{C_0}{\theta'} \frac{x_1 V}{R} - QS_1 + sQ(S_s - S_1) = 0$$

$$S_0 - \frac{k_d \theta'}{R} x_1 - \frac{C_0}{R} x_1 - S_1 + sS_1 \left(\frac{S_s}{S_1} - 1\right) = 0$$

En faisant $E = \frac{S_s}{S_1}$, $x_1 = \frac{R\{S_0 - S_1[1 - s(E - 1)]\}}{C_0 + k_d \theta'}$

et

$$C_0 = \frac{Q_e x_1 + Q_p x_s + (Q - Q_e - Q_p)x_2}{Q x_1}$$

$$= \frac{Q_p x_s + (Q - Q_e - Q_p)x_2}{Q x_1} + \frac{Q_e}{Q}$$

Q_e = Débit moyen d'échantillonnage.
Q_p = Débit moyen de la purge de boues.
x_s = Concentration en bactéries du recyclage et de la purge.
x_2 = Concentration en bactéries de l'effluent du décanteur.

SHEA *et al.* (1973) donnent en plus d'autres relations opérationnelles obtenues à partir des équations précédentes.

Par exemple,

$$\frac{\theta'}{C_0} = \frac{S_k + S_1}{(k_m - k_d)\, S_1 - S_k k_d} \text{ permet de tracer le graphe de } S_1 = f\left(\frac{\theta}{C_0}\right)$$

D'autres modèles ont été imaginés; Mc CARTY (1971), par exemple, applique la relation de MICHAELIS-MENTEN à chaque réaction de transformation du substrat et non plus seulement à la réaction globale bactéries-substrat.

ANDREWS et GRAEF (1971) proposent un modèle qui prend en compte l'effet inhibiteur que peut avoir le substrat. L'équation de MONOD est remplacée par une équation dans laquelle une constante d'inhibition Ki intervient.

$$k = \frac{k_m}{1 + \frac{S_k}{S} + \frac{S}{Ki}}$$

Le taux de croissance maximal qui peut être atteint (k'_m) est alors égal à :

$$\frac{k_m}{1 + 2\frac{S_k}{Ki}}$$

La complexité des phénomènes biochimiques de la digestion et le nombre important de paramètres qui interviennent font que, pour obtenir des modèles mathématiques utilisables, il faut faire des hypothèses simplificatrices importantes.

Cependant, en comparant des résultats expérimentaux de digestion avec les résultats calculés correspondants, comme l'a fait Mc CARTY (1971), par exemple, on a pu montrer la validité de certains modèles. Ceux-ci peuvent donc être utiles, au moins sur le plan qualitatif.

IV. — Applications de la digestion anaérobie au traitement des eaux résiduaires des industries alimentaires

La digestion anaérobie est connue et utilisée depuis longtemps mais son champ d'application s'est relativement peu élargi depuis la construction des premiers digesteurs. Sa principale utilisation reste la stabilisation des boues en excès des stations d'épuration. Cependant, l'aptitude de la digestion anaérobie à traiter des effluents très concentrés en matières organiques a conduit certains auteurs à étudier ses possibilités d'application pour la détoxification des eaux résiduaires des industries alimentaires. En particulier la digestion anaérobie apparaît comme un moyen d'épuration prometteur pour les effluents très concentrés en glucides (confiserie par exemple). Rappelons en effet que le traitement de tels rejets par

boues activées ne se fait actuellement de façon efficace que par le procédé « contact-stabilisation » à forte charge. Or celui-ci nécessite une dépense importante d'énergie; de plus, la concentration en pollution des effluents à traiter ne doit pas dépasser 15 000 à 20 000 mg/l de DCO (demande chimique en oxygène); enfin, la conduite de l'installation est rendue délicate par suite du risque d'apparition d'accidents de décantation (bulking filamenteux).

TABLEAU 2

Exemples de résultats obtenus sur la digestion anaérobie d'effluents d'I.A.A.

— Exemples nos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19 : ANDERSON et DONNELLY (1977)
— Exemple no 4 : BLACK, BROWN et KAYE (1974)
no 7 : HEMENS, MEIRING et STANDER (1972)
no 13 : SHEA *et al.* (1973)
no 14 : EDELINE (1972)
no 17 : HANSFORD et RICHTER (1974)
no 20 : AULENBACH et HALLOCK (1972)

No de l'exemple	Origine des eaux traitées	Échelle des essais	Température de digestion (°C)	Temps de séjour (jours)	Paramètre mesuré	DBO ou DCO (mg/l)	Rendement d'épuration (%)
1. .	Abattoir	Industrielle	33	0,69	DBO	1 500	93
2. .	«	«	33	2,94	«	1 500	94
3. .	«	«	33	1,25	«	2 100	96
4. .	«	«	33 à 36	6 à 18	«	1 600 à 2 100	88 à 93
5. .	Conditionnement de viande	«	35	0,50	«	1 600	95
6. .	«	«	32	0,54	«	1 380	91
7. .	Production d'amidon de maïs	«	20 à 27	2,5 à 4,5	«	6 300	88
8. .	Brasserie	«	?	2,23	«	3 280	96
9. .	Distillerie	«	30	7,20	DCO	22 400	98
10. .	«	«	30	5,30	«	12 000	97
11. .	«	«	33	6,20	DBO	25 000	96
12. .	«	«	35	0,92	«	845	93
13. .	Distillerie (rhum)	Laboratoire et pilote	33 à 36	20 à 30	DCO	70 000 à 100 000	70 à 80
14. .	Distillerie (mélasse de betterave)	Laboratoire	35	10	DBO	6 900	80 à 95
15. .	Production de levures	Industrielle	30	2,00	«	3 040	87
16. .	«	«	30	1,20	«	5 080	85
17. .	«	Laboratoire	30	variable	DCO	16 000	60 à 70
18. .	Lait	Industrielle	31	6,00	DBO	3 300	99,5
19. .	«	«	31	6,00	«	380	80
20. .	«	«	31 à 36	7	DCO	1 600 à 2 100	70 à 90

Seuls, le procédé par contact et le filtre anaérobie sont utilisés pour la digestion anaérobie des rejets des I.A.A. Il est généralement admis que les eaux contenant peu de matières en suspension risquent de diminuer la décantabilité des boues et donc le temps de rétention des solides dans le digesteur; le filtre anaérobie est particulièrement bien adapté au traitement de ce type d'effluent (LOVAN et FOREE, 1972).

Le procédé par contact a été utilisé avec des eaux de composition très diverses (tabl. 2) et les résultats obtenus sont souvent encourageants. Par exemple, des rejets provenant d'un abattoir, d'une distillerie et d'une laiterie ont été épurés respectivement à 96, 98 et 99,5 p. 100 avec des temps de séjour compris entre 1,25 et 7,2 jours. Les filtres anaérobies ont également donné de bons résultats. ANDERSON et DONNELLY (1977) rapportent des rendements d'épuration compris entre 70 et 93,5 p. 100 avec des temps de séjour de 3,56 jours sur des rejets d'industries alimentaires.

Remarquons que des temps de séjour très différents appliqués à des eaux résiduaires ayant des DBO et même des compositions voisines ont parfois conduit à des rendements d'épuration du même ordre. Ainsi, des rendements de 93 et 94 p. 100 ont été obtenus sur des eaux d'abattoir ayant la même DBO avec des temps de séjour respectifs de 0,69 et 2,94 jours.

La variabilité de ces résultats et des conditions dans lesquelles ils ont été obtenus empêche de conclure de façon définitive sur la traitabilité des divers types de rejets ou sur la nature du procédé le mieux adapté. Cependant, ces premiers résultats ouvrent la voie à des applications ultérieures. Ils montrent en particulier que des rejets riches en glucides peuvent subir avec succès un traitement anaérobie. Mais des essais ultérieurs sont nécessaires pour déterminer les systèmes les plus commodes et les plus efficaces à appliquer à chaque type de rejet.

Conclusion

En conclusion, remarquons qu'un certain nombre de voies métaboliques qui interviennent dans la digestion anaérobie sont bien établies. Il s'agit de la dégradation des oses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOFF, de la β-oxydation des acides gras à longue chaîne et des mécanismes classiques de dégradation des acides aminés (transamination, désamination, décarboxylation).

Mais la compréhension de l'ensemble du déroulement de la digestion suppose que l'on précise plusieurs autres points. En ce qui concerne la phase d'acidogenèse, le devenir de l'acide pyruvique formé par la glycolyse n'est pas encore parfaitement appréhendé. Il est en particulier nécessaire de préciser dans quelle mesure il participe à la formation de l'acide acétique, de ses homologues supérieurs et de l'acide lactique. En effet, on admet classiquement que l'acétate formé dans les digesteurs provient essentiellement des acides gras à longue chaîne. Il nous semble donc intéressant de préciser, dans le cas d'une digestion d'effluents riches en glucides et pratiquement dépourvus de lipides (tels ceux des I.A.A.), si le pyruvate fournit directement l'acide acétique par décarboxylation ou s'il est utilisé à la synthèse de lipides bactériens libérés dans le milieu de digestion par l'autolyse des cellules. De même, la connaissance de la digestion nécessite que l'on précise l'importance relative de mécanismes parallèles tels que la voie des pentoses ou les fermentations de l'acide pyruvique en lactate, butyrate, propionate, etc.

Dans le cas de la méthanogenèse, si le mécanisme général est entrevu, il convient de lever l'ambiguïté qui existe entre la nature du précurseur essentiel du méthane (l'acétate) et le fait que l'on isole des digesteurs essentiellement des bactéries productrices de méthane utilisant le gaz carbonique et l'hydrogène. Cependant, le progrès en ce domaine est largement conditionné par la mise au point de méthodes satisfaisantes pour l'isolement et le dénombrement des bactéries des digesteurs.

Sur le plan de l'épuration des rejets des I.A.A. par digestion anaérobie, les premiers résultats acquis sont particulièrement prometteurs. Cependant, de nombreux autres travaux sont nécessaires pour préciser le traitement le mieux adapté à un type donné d'effluent. Il conviendra par ailleurs d'attacher une attention toute particulière aux effluents renfermant des composés peu biodégradables, tels les complexes ligno-cellulosiques ou l'amidon natif.

Reçu pour publication en janvier 1978.

Summary

Anaerobic digestion, its application to agronomic and food industries

For a complete knowledge of anaerobic digestion it is necessary to understand its biochemical and microbiological aspects. So the main part of this paper is a review and discussion of the biochemistry and the microbiology of the acidic and methanogenic phases. Furthermore, the most common digestion processes are described, characterized, and a simple mathematical model is applied to them. The current applications and the possible developments of anaerobic digestion for the treatment of strong organic waste from the food industry are presented.

Références bibliographiques

ALLISON M. J., ROBINSON I. M., 1970. Biosynthesis of α-ketoglutarate by the reductive carboxylation of succinate in *Bacteroides ruminicola*, *J. Bacteriol.*, 104, 50.

ANDERSON G. K., DONNELLY T., 1977. Anaerobic digestion of high strength industrial wastewaters. *Public. Health Eng.*, **5**, n° 3, 64-71.

ANDREWS J. F., GRAEF S. P., 1971. Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process. *Adv. Chem. Ser. USA.*, **105**, 126-162.

ARANKI A., FRETER R., 1972. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1329-1334.

ARANKI A., SYED S. A., KENNEY E. B., FRETER R., 1969. Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. *Appl. Microbiol.*, **17**, 568.

AULENBACH D. B., HALLOCK R. V., 1972. Treatment of milk truck washing wastes by anaerobic digestion. *Eng. Bull. Purdue Univ.*, **141**, 126-136.

BARKER H. A., 1956. Bacterial fermentations. p. 1 John Wiley and sons. Inc. New York.

BLACK M. G., BROWN J. M., KAYE E., 1974. Operational experiences with an abattoir waste digestion plant at Leeds. *Water Poll. Control* (GB), **73**, 532-537.

BLAYLOCK B. A., 1968. Cobamide — dependent methanol — cyanocob (1) alamin methyl transferase of methanosarcina barkeri. *Arch. of biochem. and bioph.*, **124**, 314-324.

BRYANT M. P., WOLIN E. A., WOLIN M. J., WOLFE R. S., 1967. *Methanobacillus omelianskii* a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv. für Mikrobiol.*, **59**, 20-31.

BRYANT M. P., TZENG S. F., ROBINSON I. M., JOYNER A. E., 1971. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Adv. Chem. Ser.*, **105**, 23-40.

BRYANT M. P., Mc BRIDE B. C., WOLFE R. S., 1968. Hydrogen — oxidizing methane bacteria. I. Cultivation and methanogenesis. *Jour. of Bacteriol.*, **95**, 3, 1118-1123.

CHUNG K. T., 1972. An ecological significance of hydrogen utilisation in methanogenesis. *Abstr. Annu. Gen. Meeting Ann. Soc. Microbiol.*, p. 64.

CHYNOWETH D. P., MAH R. A., 1971. Volatile acid formation in sludge digestion. *Adv. Chem. Ser.*, **105**, 41-54.

ECKENFELDER W. W., 1966. Industrial Water pollution control, 217-227, Mc Graw-Hill Book Company, USA.

EDELINE F., 1972. Les eaux résiduaires de sucreries et de distilleries de mélasse. 12e Symposium International, Budapest, Mars 1970, 375-385. Éditions Dr. JUNK N. V., La Haye.

EDWARDS T., Mc BRIDE B. C., 1975. New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **29**, 540-545.

EL-SHAFIE A. T., BLOODGOOD DON E., 1973. Anaerobic treatment in a multiple upflow filter system. *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **45**, 2345-2357.

FINNEY C. D., EVANS II R. S., 1975. Anaerobic digestion: The rate-limiting process and the nature of inhibition. *Science*, **190**, 1088-1089.

GATES W. E., SMITH J. H., LIN S. D., RIS III C. H., 1967. A rational model for the anaerobic contact process. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **39**, 12, 1951.

GHOSH S., POHLAND F. G., 1974. Kinetics of substrate assimilation and product formation in anaerobic digestion. *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **46**, 748-759.

GHOSH S., CONRAD J. R., KLASS D. L., 1975. Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **47**, 30-45.

HALLIWELL G., BRYANT M. P., 1936. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 441.

HANSFORD G. S., RICHTER H. I. H., 1974. Anaerobic digestion of yeast waste. 7th International Conference on Water Pollution Research, Paris 9-13/9-74, 8Cl, 22 p.

HARKNESS N., 1966. Bacteria in sewage treatment processes. *J. Proc. Inst. Sewage Purif.*, Part 6, 542.

HEMENS J., MEIRING P. G. J., STANDER G. J., 1972. Full scale anaerobic digestion of effluents from the production of maize-starch. *Water and waste treatment*, n° 5-6, p. 171.

HENDERSON C., HOBSON P. N., SUMMERS R., 1969. The production of amylase, protease and lipolytic enzymes by two species of anaerobic rumen bacteria in continuous cultivation of microorganisms. Proc. 4th Symposium, Academia, Prague, 189.

HEUKELEKIAN H., HEINEMANN B., 1939. Studies on the methane bacteria. I. Development of a method for enumeration. *Sewage Wks J.*, **11**, 426-435.

HEUKELEKIAN H., MUELLER P., 1958. Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. *Sewage Ind. Wastes*, **30**, 1108.

HOBSON P. N., BOUSFIELD S., SUMMERS R., 1974. Anaerobic digestion of organic matter. *Crit. Rev. Environ. Control*, **4**, 131-191.

HOBSON P. N., SHAW B. G., 1971. Microbial aspects of pollution (SYKES G. et SKIMMER F. A.) p. 103-121. Academic Press London New York.

HOBSON P. N., SHAW B. G., 1976. Inhibition of methane production by *Methanobacterium formicicum*. *Water Res.*, **10**, 849-852.

HUNGATE R. E., 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bact. rev.*, **14**, 1.

IANNOTTI Z. L., KAFKEWITZ D., WOLIN M. S., BRYANT M. P., 1973. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio Succinogenes* : changes caused by interspecies transfer of H_2. *J. Bacteriol.*, **114**, 1231.

JERIS J. S., Mc CARTY P. L., 1965. The biochemistry of methane fermentation using C^{14} tracers. *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **37**, 178-192.

KIRSCH E. J., 1969. Studies on the enumeration and isolation of obligately anaerobic bacteria from digesting sludge. *Dev. Ind. Microbiol.*, **10**, 170.

KOTZE J. P., THIEL P. G., TOERIEN D. F., HATTINGH W. H. J., SIEBERT M. L., 1968. A biological and chemical study of several anaerobic digesters. *Water Res.*, **2**, 195-213.

KOTZE J. P., THIEL P. G., HATTINGH W. H. J., 1969. Anaerobic digestion II The characterization and control of anaerobic digestion. *Water Res.*, **3**, 459-494.

LOVAN C. R., FOREE E. G., 1972. The anaerobic filter for the treatment of brewery press liquor waste. *The Brewers digest.*, **47**, 66-73.

Mac BRIDE B. C., WOLFE R. S., 1971. A new coenzyme of methyl transfer, coenzyme M. *Biochemistry*, **10**, 2317-2324.

a) Mac CARTY P. L., 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals. Part two: Environmental requirements and control. *Public Works*, **95**, 10, 123-126.

b) Mac CARTY P. L., 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals. Part three: Toxic materials and their control. *Public Works*, **95**, 11, 91-94.

Mac CARTY P. L., 1971. Energetics and kinetics of anaerobic treatment. *Adv. Chem. Ser.*, **105**, 91-107.

Mac CARTY P. L., JERIS J. S., Mac KINNEY R. E., REED K., VATH C. A., 1962. Microbiology of anaerobic digestion. Rept. N° R 62-29, Sedgewick Lab. Sanit. Sci. Mass. Inst. Tech., Cambridge, Mass.

MAH R. A., SUSSMAN C., 1967. Microbiology of anaerobic sludge fermentation — I — Enumeration of the nonmethanogenic anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.*, **16**, 358-361.

MAKI L. W., 1954. Experiments on the microbiology of cellulose decomposition in a municipal sewage plant. *Antonie van Leeuwenhock.*, **20**, 185.

MONOD J., 1950. La technique de culture continue. Théorie et applications. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 390-410.

MOSEY F. E., 1976. Assessment of the maximum concentration of heavy metals in crude sewage which will not inhibit the anaerobic digestion of sludge. *Water Poll. Control* (G.B.), **75**, 10-20.

NOTTINGHAM P. M., HUNGATE R. E., 1969. Methanogenic fermentation of benzoate. *J. Bacteriol.*, **98**, 1170.

NOVAK J. T., RAMESH M. S., 1975. Stimulation in anaerobic degradation. *Water Res.*, **9**, 963-967.

NOVELLI G. D., 1955. The exchange of $^{14}HCOOH$ with the carboxyl group of pyruvate by *Clostridium butyricum* et *Micrococcus lactilyticus*, *Biochim. Biophys., Acta*, **18**, 594.

POHLAND F. G., GHOSH S., 1971. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes. The two phase concept. *Environ. Letters.*, **14**, 255-266.

SHAW B. G., 1971. A practical bacteriological study of the anaerobic digestion of waste from an intensive pig unit. Ph. D. Thesis, University of Aberdeen. Aberdeen. Scotland.

SHEA T. G., RAMOS E., RODRIGUEZ J., DORION G. H., 1973. Investigation of rum distillery. slops treatment by anaerobic contact process. Rapport EPA 660-2/73-031, 155-198.

SIEBERT M. L., HATTINGH W. H. J., 1967. Estimation of methane producing bacterial numbers by the most probable number (MPN) technique. *Water Res.*, **1**, 13-19.

SIEBERT M. L., TOERIEN D. F., 1969. The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.*, **3**, 241.

SMITH P. H., MAH R. A., 1966. Kinetics of acetate metabolism drug sludge digestion. *Appl. Microbiol.*, **14**, 368-371.

TAYLOR G. T., 1975. The formation of methane by bacteria. *Process Biochem.*, **10**, 10, 29-33.

TAYLOR C. D., WOLFE R. S., 1974. Structure and methylation of coenzyme M ($HSCH_2$-CH_2-SO_3). *The Jour. of Biological Chemistry*, **249**, 15, 4879-4885.

THIEL P. G., TOERIEN D. F., HATTINGH W. H. J., KOTZE J. P., SIEBERT M. L., 1968. Interrelations between biological and chemical characteristics in anaerobic digestion. *Water Res.*, **2**, 391-408.

THIEL P. G., 1969. The effect of methane analogues on methanogenesis in anaerobic digestion. *Water Res.*, **3**, 215-223.

TOERIEN D. F., 1967. Enrichment culture studies on anaerobic and facultative anaerobic bacteria found in anaerobic digesters. *Water Res.*, **1**, 147-155.

TOERIEN D. F., SIEBERT M. L., HATTINGH W. H. J., 1967. The bacterial nature of the acid-forming phase of anaerobic digestion. *Water Res.*, **1**, 497-507.

TOERIEN D. F., THIEL P. G., HATTINGH W. H. J., 1968. Enumeration, isolation and identification of sulphate reducing bacteria of anaerobic digestion. *Water Res.*, **2**, 505.

WENG C. N., JERIS J. S., 1976. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Res.*, **10**, 9-18.

WOLFE R. S., 1971. Microbial formation of methane. *Adv. Microb. Physiol.*, **6**, 107-146.

WOOD T. M., 1970. Cellulose and cellulolysis. *World Rev. Nutr. Diet.*, **12**, 227-265.

YOUNG J. C., Mac CARTY P. L., 1969. The anaerobic filter for waste treatment. *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **41**, R 160-R 173.

ZEIKUS J. G., 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol Rev.*, **41**, 2, 514-541.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (2), 565-584.

Réunion des chercheurs en viande

PARIS 13-14 DÉCEMBRE 1977

La première réunion des chercheurs en viande français s'est tenue à Paris, au Ministère de l'Agriculture, les 13 et 14 décembre 1977. Organisée par le Laboratoire de recherches sur la viande de l'I.N.R.A., cette réunion a rassemblé 110 personnes. Trente-cinq communications ont été présentées, dont on trouvera ci-dessous le résumé.

Variabilité génétique entre souches des caractéristiques bouchères du lapin (1)

J. OUHAYOUN, Danièle DELMAS et B. POUJARDIEU

Station d'Amélioration génétique des Animaux,
Centre de recherches de Toulouse, I.N.R.A.,
31320 Castanet-Tolosan

Les relations interraciales entre les composantes analytiques de caractéristiques bouchères du Lapin sont étudiées.

325 lapereaux métis, issus de femelles nullipares *I.N.R.A. 1067* et de mâles de 7 souches différant par le poids adulte, sevrés à 4 semaines, élevés de façon contemporaine et abattus à 11 semaines, sont examinés. Les souches paternelles sont géantes (*Géant des Flandres* : 5,8 kg; *Géant du Bouscat* : 5,3 kg), moyennes (*I.N.R.A. 1027*, sélectionnés expérimentalement sur la vitesse de croissance : 3,8 kg; *I.N.R.A. 1077*, souche témoin conduite sans sélection : 3,7 kg; *Rex havane* : 3,5 kg) et de petit format (*I.N.R.A. 1089* : 2,8 kg; *Nain de couleur* : 1,7 kg).

Le poids à 11 semaines (2,01 à 2,91 kg), qui est fortement lié au poids adulte des pères ($r = 0{,}88^{**}$) est en corrélation avec la vitesse de croissance ($r = 0{,}99^{**}$) entre 4 et 11 semaines (27,8 à 43,4 g/j) et avec l'indice de consommation ($r = -0{,}85^{*}$) pendant la même période (3,6 à 4,5).

Le poids à l'abattage est en corrélation positive avec la compacité (poids/longueur) de la carcasse (2,5 à 2,1 g/mm; $r = 0{,}96^{**}$) et la teneur en eau du tissu musculaire (73,8 à 72,1 p. 100; $r = 0{,}95^{**}$), et en corrélation négative avec le taux de lipides musculaires (3,3 à 4,7 p. 100; $r = -0{,}90^{**}$), l'adiposité interscapulaire (0,48 à 0,95 p. 100 de la carcasse; $r = -0{,}95^{**}$), voire périrénale (1,66 à 3,05 p. 100; $r = -0{,}71$ NS) et l'activité de la voie oxydative du métabolisme énergétique musculaire appréciée par ICDH (4,4 à 5,5 ui/mn/g; $r = -0{,}82^{*}$).

La vitesse de croissance au cours de la 11e semaine (19,7 à 36,6 g/j), la vitesse de croissance relative pendant cette période (9,2 à 13,3 g/j/kg) et la fraction du poids vif représentée par le tractus digestif (0,239 à 0,264) : trois quantités qui sont d'autant plus faibles que les animaux ont une maturité élevée, sont en corrélation négative ($-0{,}80^{*}$; $-0{,}93^{**}$; $-0{,}97^{**}$) avec le ren-

(1) Étude financée par le Comité de Technologie alimentaire et agricole de la D.G.R.S.T. (contrat 75 7 0359).

dement à l'abattage (62,1 à 59,4 p. 100) et la teneur en myoglobine musculaire (— 0,88**; — 0,90**; — 0,87**) dont les valeurs moyennes sont comprises entre 120 et 105 mg/100 g.

Le rapport muscle/os du membre postérieur (6,2 à 5,4) est lié, à la fois, au poids corporel à 11 semaines (r = — 0,75* : valeur élevée malgré le fort rapport muscle/os des enfants des *Géants des Flandres*), et aux trois caractères considérés ci-dessus comme exprimant indirectement la maturité (— 0,93**; — 0,75*; — 0,75*).

Cette étude met en valeur l'indépendance pouvant exister entre les diverses expressions de la maturité corporelle. Ainsi, les métis de pères *Géants des Flandres* ont, pour certains caractères (rendement à l'abattage, rapport muscle/os, vitesse de croissance en fin d'engraissement) la maturité élevée des produits de la souche *Naine*, et pour d'autres (teneurs en eau et en lipides musculaires, adiposité des carcasses, vitesse de croissance et indice de consommation entre 4 et 11 semaines), le défaut de maturité des souches de format plus élevé.

Cycle œstrien et qualité de la viande de porc

P. SELLIER et C. LEGAULT

Station de génétique quantitative et appliquée,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

A l'occasion de la comparaison entre verrats Landrace Belge et verrats Piétrain sur les performances d'engraissement et de carcasse de leurs produits de croisement, alimentés à volontés et abattus au poids vif moyen de 100 kg, il a été possible d'étudier l'influence du stade du cycle œstrien de la femelle sur la qualité technologique de la viande, l'examen du tractus génital et des ovaires ayant été effectué à l'abattage et ayant montré que 55 p. 100 de l'ensemble des femelles étaient pubères. Quatre catégories d'animaux, dont les effectifs sont respectivement 168, 59, 15 et 56, ont été considérées : 1. mâle castré; 2. femelle impubère; 3. femelle en pro-œstrus (stade folliculaire avancé) ou en œstrus; 4. femelle ayant ovulé depuis au moins 4 jours (phase lutéinique). Les moyennes de ces 4 catégories d'animaux ont été estimées par la méthode des moindres carrés, en tenant compte des facteurs type génétique et date d'abattage, pour 8 critères mesurés 24 h *post mortem* : pH des muscles *Adductor Femoris* (Af), *Biceps femoris* (Bf), *Gluteus superficialis* (Gs) et *Longissimus dorsi* (Ld), réflectance et pouvoir de rétention d'eau des muscles Bf et Gs.

Les différences entre les catégories décrites ci-dessus sont significatives pour le pH du muscle Ld ($P < 0,01$) et le pouvoir de rétention d'eau du muscle Gs ($P < 0,05$), une tendance étant trouvée pour le pH du muscle Gs ($P < 0,10$). Pour ces deux dernières variables, on retrouve la différence connue entre mâles castrés et femelles mais aucune différence n'est mise en évidence entre les 3 catégories de femelles. Par contre, pour le pH du muscle Ld, on observe une différence significative entre la moyenne des mâles castrés et des femelles impubères (5,41) d'une part et la moyenne des deux catégories de femelles pubères (5,34) d'autre part. Ces premières observations n'indiquent pas d'influence vraiment notable du stade du cycle œstrien des femelles sur les critères indicateurs de la qualité technologique de la viande.

Importance des variations entre types génétiques des qualités de viandes chez les jeunes bovins

F. MENISSIER, F. BERTAUX, B. BIBÉ, B. BONAITI, J.-J. COLLEAU, J. FREBLING, J. GAILLARD et J. SAPA

Station de génétique quantitative et appliquée,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

L'exploitation de bovins de plus en plus spécialisés (lait ou viande), à fort potentiel de production et engraissés intensivement, s'accompagne certainement de modifications des qualités de viande. A partir des mesures physico-chimiques (cisaillement, pH, pertes d'eau, teneur en fer

héminique) faites une semaine après abattage sur le muscle *longissimus dorsi* voir aussi sur le *pectoralis profondus*, nous cherchons à préciser l'importance des variations observées lors de nos divers essais de comparaison entre différents types génétiques de jeunes bovins intensifs (mâles et femelles) abattus aux âges de 14 à 22 mois.

Malgré des conditions de milieu et de contrôles assez homogènes, la variabilité des mesures de qualités de viande (sauf le pH) reste élevée et supérieure à celle des autres performances. Intra-expérience, nous avons d'abord noté des corrélations positives entre les mesures faites sur le *longissimus dorsi* et le *pectoralis profondus* (cisaillement, 0,42 et 0,48; pH 0,62; pertes d'eau : 0,57; teneur en fer : 0,69); puis, pour chacun des muscles respectivement, seul le travail avec l'effort de cisaillement (r = 0,58 et 0,57) et le pH avec les pertes d'eau (r = 0,63 et — 0,37) sont liés. Nous avons mis en évidence l'incidence de quelques facteurs de variations dues au milieu, tels que l'année, le sexe, l'âge d'abattage et le trasnport avant l'abattage en partie confondu avec le lieu d'abattage et de contrôle.

Les comparaisons entre types génétiques sont discutées par expérience entre types laitier (*Holstein*), mixte (*Normand*), viande (*Charolais*) et croisés; entre croisés *Charolais* × *Frison* issus de pères culards et normaux; entre types rustiques (*Aubrac* ou *Gascon*), viande (*Charolais*, *Blond d'Aquitaine*) et croisés; entre races à viande (*Charolais*, *Limousin et Maine-Anjou*). D'une façon générale avec l'accroissement de la charnure, outre les modifications des qualités des carcasses (plus de poids, moins de gras et d'os, meilleure compacité), nous observons une réduction significative de la teneur en fer et une tendance à un moindre effort de cisaillement, alors que le pH et les pertes d'eau sont peu modifiées (légère réduction de la capacité de rétention d'eau). Les relations intra-types génétiques avec les aptitudes bouchères et laitières sont plus difficiles à mettre en évidence.

Dans l'état actuel de nos possibilités, d'une part, nous poursuivons ces observations sur des types génétiques encore plus variés (races étrangères) et, d'autre part nous essayons d'observer ces qualités de viande dans le cadre des schémas des sélections des taureaux destinés au croisement industriel.

Les caractéristiques musculaires, les facteurs technologiques et la qualité de la viande de lapin

A. LACOURT et C. TOURAILLE

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, Saint-Genès-Champanelle, 63110 Beaumont

Plusieurs souches de lapins ayant un poids adulte et une vitesse de croissance très différents ont été étudiées. Les facteurs technologiques tels que le mode d'assommage et la cinétique de réfrigération ont été testés sur des lapins âgés de 11 semaines et de race Néo-Zélandaise. Trois catégories d'investigations ont été menées simultanément :

1) Caractérisation histochimique et biochimique des types métabolique et contractile de trois muscles qui diffèrent par leur teneur en myoglobine : le m. *Longissimus dorsi* (L.D.), le m. *Adductor magnus et brevis* (A.C.) et l'ensemble des deux muscles : *Soleus* et *Vastus intermedius* (S + VI).

2) Étude de la cinétique de la *Rigor mortis* dans les deux muscles L.D. et A.C. en relation avec le format et l'âge des animaux.

3) Appréciation par un jury de dégustation des qualités organoleptiques comparées du râble et de la patte arrière des différents lots de lapins.

Les caractéristiques musculaires sont en relation avec les souches de lapins mais sont indépendantes du format des animaux. Parmi les différents critères d'appréciation de la qualité de la viande, la perte de poids à la cuisson est remarquablement liée au poids adulte des lapins. Les petits animaux sont moins secs et plus agréables que les carcasses de grand format.

Il est possible et nécessaire de réfrigérer rapidement les carcasses de lapins à la condition, toutefois, de ne pas abaisser la température musculaire au-dessous de 5 °C au cours des quatre premières heures qui suivent l'abattage et ceci afin d'éviter les risques de rétraction au froid.

Effet de la castration tardive sur les qualités des viandes de différentes races

J. ROBELIN* et R. BOCCARD**

* *Laboratoire de la Production de Viande,*
** *Station de recherches sur la Viande,*
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

Les difficultés de mise en marché des animaux mâles entiers ont redonné de l'intérêt à la castration pour laquelle de nouvelles techniques ou modalité d'application ont été proposées.

Pour bénéficier de la forte vitesse de croissance des taurillons et des bénéfices sur la qualité de la viande une castration tardive a été suggérée.

Trois races tardives ou précoces (Charolaise, Normande, Frisonne) spécialisées ou non dans la production de viande et le croisement Ch × N ont été utilisés. 1/3 des animaux de chaque type étant respectivement castrés à 13 mois, à 17 mois ou conservés entiers. Tous les animaux ont été abattus à 24 mois. Sur 5 muscles : *Longissimus dorsi - Pectoralis profundus - Semi tendinosus - Semi membranosus - Triceps brachii caput laterale*, les principales caractéristiques de la qualité ont été mesurées : teneur en pigments — tendreté par cisaillement — teneur en collagène. Sur deux d'entre eux P.A. et L.D. et l'aponévrose du L.D., la solubilité du collagène a été déterminée.

Sur le plan général il apparaît une indépendance des caractères de la couleur et ceux de la tendreté.

Sur le plan de la tendreté, l'effet de cisaillement et la teneur en collagène sont liés alors que la solubilité (critère d'âge physiologique) est en opposition. Ceci entraîne le fait que les animaux sont d'autant plus durs qu'ils ont plus de collagène et que celui-ci est moins soluble.

Quant à la pigmentation, elle évolue dans les mêmes conditions que la quantité de lipides intramusculaires dans le L.D. ce qui peut paraître un critère de maturation.

Sur le plan racial, les Charolais apparaissent les moins gras et les moins colorés. Ils sont légèrement moins durs, ayant à 24 mois légèrement moins de collagène et celui-ci étant plus soluble.

Les mâles entiers sont moins gras et moins colorés que les castrés. Ils ont plus de collagène mais plus soluble que les castrés à 13 mois. Les castrés à 18 mois ont comme les mâles plus de collagène mais, comme il est moins soluble, ils sont plus durs.

Étude comparative de la trame conjonctive intramusculaire de différentes espèces d'animaux (bovins, ovins, porcins et caprins)

O. SCHMITT

Laboratoire de recherches sur la Viande,
Centre de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Sur des animaux à la naissance, la comparaison à l'échelle macroscopique de la trame conjonctive intramusculaire du muscle *Semitendinosus* de veau, d'agneau, de chevreau et de porcelet, permet de distinguer nettement le veau des autres types d'animaux en raison du plus grand développement en taille et en épaisseur de ses différents éléments. La structuration y atteint déjà une valeur semblable à celles observées chez les animaux plus âgés. La distinction entre les autres espèces sur la base des caractères de la trame principale est très délicate. L'examen à la coupe binoculaire (× 10 à 30) permet de distinguer les trois espèces sur la base d'une structuration plus forte pour l'agneau et sur l'immaturité du développement des fibres musculaires en ce qui concerne le porcelet.

Dans le cas du muscle *Semimembranosus* le veau se distingue également comme précédemment des autres espèces. Entre elles ces dernières peuvent être caractérisées par l'importance du conjonctif total, beaucoup plus forte chez l'agneau que chez le chevreau et surtout que chez le porcelet, et par l'épaisseur des parois délimitant les unités de structure, très fine chez le por-

celet, plus marquée chez le chevreau, et surtout chez l'agneau. La structuration de l'agneau est plus forte que celle des deux autres espèces.

Chez des animaux plus âgés et plus lourds l'examen de la trame conjonctive périmysiale principale du muscle *Semitendinosus* révèle une similitude dans son organisation générale, en raison de l'identité de la forme des unités de structure. Cette ressemblance s'accompagne toutefois de différence très importante dans la taille des unités de structure et dans l'épaisseur de la trame principale qui délimite ces unités au sein du muscle. Les bovins et les porcins ont les plus grandes unités et les bovins présentent, par rapport aux autres espèces ,des épaisseurs des parois de la trame plus importantes. La présence et l'importance en taille des nœuds au sommet des unités de structure sont également variables selon les espèces. Au sein de la trame périmysiale secondaire on observe entre espèces des différences marquées dans la structuration qui diminue quand on passe des bovins aux porcins, aux ovins et aux caprins.

Des conclusions semblables peuvent être tirées de la comparaison entre espèces dans le cas du muscle *Semimembranosus*, à l'exception de ce qui concerne les nœuds de la trame conjonctive, pratiquement absents dans ce type de muscle quelle que soit l'espèce.

Relations entre syndrome d'hyperthermie maligne et qualité de la viande chez le porc

G. MONIN*, L. OLLIVIER ** et P. SELLIER**

* *Station de recherches sur la Viande,*
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont
** *Station de génétique quantitative et appliquée,*
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Le matériel animal utilisé pour cette étude comprenait 35 porcs de race *Piétrain* (15 mâles castrés et 20 femelles) issus de 7 portées. Soumis à l'administration d'halothane à l'âge de dix semaines environ, 19 n'avaient montré aucune réaction tandis que 16 développaient le syndrome d'hyperthermie maligne.

Engraissés à Avord (Cher), les animaux étaient transférés à Theix (Puy-de-Dôme) lorsqu'ils atteignaient le poids de 92 kg et étaient abattus 4 jours après leur arrivée. Des mesures étaient réalisées sur le muscle *Long dorsal* et divers muscles du jambon pendant les 24 h suivant l'abattage. Les résultats montrent que chez les porcs sensibles à l'administration d'halothane, la rigidité cadavérique s'installe plus rapidement et la température musculaire est plus élevée, surtout dans le jambon. Ceci entraîne des modifications signaficatives du caractère exsudatif de la viande et du rendement technologique de la transformation du jambon en « jambon de Paris ». La diminution du rendement technologique chez les porcs sensibles à l'halothane contrebalance presque leur avantage de rendement anatomique et le rendement global de la transformation est à peu près le même chez les deux types de porcs. Les différences entre ces résultats et les observations réalisées précédemment par les auteurs (*Journées de la Recherche Porcine en France 1976*, 229-237) sont discutées.

Étude comparée de la microhétérogénéité des myoglobines des porcs normaux et exsudatifs de la race piétrain

M. RENERRE

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

Cette étude qui a porté sur 13 porcs de race Piétrain pesant 90 kg (± 3 kg) a consisté à comparer la microhétérogénéité de la myoglobine de porcs normaux et de porcs exsudatifs.

L'examen des courbes d'enregistrement du pH des échantillons musculaires ainsi que le

test au halothane effectué sur l'animal vivant permettent de classer les animaux en fonction de leur vitesse de chute de pH.

On a procédé à l'extraction des protéines sarcoplasmiques 15 min et 4 h après l'abattage. Les protéines sarcoplasmiques ont été purifiées par passage successif sur DEAE — cellulose et sur Sephadex G 50.

La microhétérogénéité des diverses protéines sarcoplasmiques a été analysée par isoélectrofocalisation sur plaques de gel de polyacrylamide.

Il apparaît immédiatement après l'abattage une différence significative au niveau de la microhétérogénéité du pigment entre porcs normaux et exsudatifs. Cette différence ne s'observe plus lorsque la myoglobine est extraite 4 h *post mortem*.

Influence de la conformation sur la texture des muscles de bovins

B. L. DUMONT

Laboratoire de recherches sur la Viande,
Centre national de recherche agronomique, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Les relations existant chez les bovins entre la conformation des carcasses et la texture des muscles ont été étudiées en considérant, sur un lot de bœufs, les variations en fonction de la conformation — jugée objectivement d'après la méthode normalisée de la F.E.Z. — de la force de cisaillement des muscles crus mesurée par l'appareil de Warner-Bratzler et de la teneur en tissu conjonctif, exprimée par la valeur :

$$\frac{\text{N hypro}}{\text{N total}} \times 1\,000.$$

Dans l'échantillon des huit muscles étudiés (*Psoas major*, *Adductor*, *Teres major*, *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii caput longum*, *Semitendinosus*, *Pectoralis profundus et Rhomboideus*) les muscles les plus tendres proviennent, en général, des animaux les mieux conformés et la variation de la conformation explique en moyenne 60 p. 100 de la variation des forces de cisaillement. D'autre part, les muscles des animaux les mieux conformés renferment moins de collagène que les autres, la variation de la conformation expliquant de 57 (*Adductor*) à 98 p. 100 (*Rhomboideus*) de la variation du rapport :

$$\frac{\text{N hypro}}{\text{N total}} \times 1\,000.$$

L'influence de la conformation sur ce rapport est d'autant plus marquée que les muscles présentent, chez des animaux de mauvaise conformation, des valeurs élevées de ce rapport (muscles *Pectoralis profundus* et *Rhomboideus*).

L'ensemble des résultats conduit, dans le cas des bœufs, à considérer la *conformation* comme l'un des facteurs importants de l'explication de la variation de la texture des muscles et de leur dureté.

Cartographie du pH dans les carcasses de gros bovins

J. SORNAY et P. LEGRAS (*)

Institut technique de l'Élevage bovin,
149, rue de Bercy,
75012 Paris

La seule méthode fiable actuellement pour la détection des carcasses présentant le caractère « pH élevé » (pH moyen ultime $> 6{,}0$) consiste à mesurer le pH musculaire dans les 24 à 48 h qui suivent l'abattage.

(*) Avec la collaboration de J. MORAND.

L'objet de l'étude était de dresser une cartographie des muscles par rapport à la valeur du pH ultime en vue de définir les muscles assurant la meilleure prédiction du pH moyen de la carcasse.

L'étude portait sur 18 gros bovins dont 11 présentaient le caractère pH élevé; les pH étaient mesurés dans 41 muscles avec 7 répétitions pour chaque muscle.

L'analyse de variance montre tout d'abord une covariabilité très élevée entre muscles. Il apparaît qu'en plus des variations entre animaux, il y a des différences de pH entre muscles pour une carcasse donnée, et souvent à l'intérieur d'un même muscle. De plus il existe une interaction significative animal × muscle.

De l'ensemble des analyses effectuées, c'est le pectoral qui se révèle être le meilleur estimateur du pH moyen de la carcasse (coeff. de corrélation $r = 0{,}962$ écart-type résiduel $s = 0{,}113$).

Les muscles couramment utilisés pour les mesures de pH, Demi Tendineux et Long Dorsal, sans être les meilleurs prédicteurs sont toutefois en assez bonne relation avec le pH de la carcasse (respectivement $r = 0{,}898$, $s = 0{,}184$ et $r = 0{,}892$, $s = 0{,}189$).

Enfin bien que les niveaux de prédiction obtenus soient élevés, l'existence d'une interaction animal × muscle entraîne une incertitude dans la mesure où sans qu'on puisse le prévoir à partir de quelques mesures, certaines carcasses à pH normal peuvent présenter quelques muscles à pH > 6, et inversement. Mais du fait de la covariabilité élevée entre muscles, il n'est possible en aucun cas de récupérer sur les carcasses à pH élevé une région entière dont le pH serait normal.

Biochimie comparée du tissu musculaire de taureaux Maine-Anjou culards et normaux

J. OUHAYOUN et Danièle DELMAS

Station d'Amélioration génétique des Animaux
Centre de recherches de Toulouse, I.N.R.A.,
31320 Castanet-Tolosan

Six taurillons de race *Maine Anjou*, porteurs du caractère culard, âgés de 22 mois environ, sont comparés sur les caractéristiques de cinq muscles, hypertrophiés (*cutaneus trunci* : CT; *tensor fasciae latae* : TFL), isotrophié (*longissimus dorsi* : LD) ou hypotrophiés (*obliquus abdominis internus* : OAI; *diaphragma* : D), à des taurillons normaux ayant un poids de carcasse non significativement différent (P > 0,05) en deux séries de trois couples chacune.

Les individus culards, dont la vitesse de croissance est moins grande, sont plus âgés (1re série : + 6,1 p. cent; 2e série : + 3,3 p. cent). Ils présentent un poids vif inférieur (— 9,1 p. cent; — 0,4 p. cent), mais un rendement commercial plus élevé (+ 8,8 p. cent; + 8,6 p. cent). Les proportions de tissus osseux, musculaire et adipeux sont déterminées par dissection d'une demi-carcasse (1re série) ou de la 11e côte (2e série). La musculature des culards est significativement hypertrophiée (+ 13,4 p. 100; + 32,4 p. 100), le tissu adipeux est réduit (— 54,7 p. 100; — 65,7 p. 100) ainsi que le squelette (— 15,9 p. 100; — 3,4 p. 100) (1).

Les muscles des culards contiennent plus d'ADN que les muscles homologues des normaux (P < 0,05); la différence n'est pas significative pour l'OAI (0,6 < P < 0,7) .La masse moyenne des cellules, représentée par l'inverse de la teneur en ADN, est inférieure chez les culards (OAI, CT, TFL, LD : P < 0,05; D : 0,2 < P 0,3). Les muscles des culards sont donc affectés d'une hyperplasie et d'une hypotrophie pondérale de leurs cellules virtuelles constitutives.

La voie oxydative du métabolisme énergétique, estimée par l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase (ICDH) est déprimée chez les culards, en particulier dans le muscle TFL (P < 0,05); les muscles CT et LD n'expriment qu'une tendance à la dépression (0,4 < P < 0,5). Le muscle OAI ne diffère pas entre types. Le muscle D est plus oxydatif chez les culards (0,05 < P 0,1). Le classement des muscles par ordre d'activité oxydative croissante, qui est commun aux deux types (CT, TFL, LD, OAI, D) indique que la dépression affecte de façon plus sensible les muscles dont le métabolisme oxydatif est faible. La teneur en pigments héminiques, qui est en corrélation très élevée avec l'activité ICDH (0,82** chez les culards; 0,83** chez les normaux), est plus basse

(1) Les données d'élevage et anatomiques nous ont été aimablement communiquées par MM. MENISSIER et DUMONT.

chez les culards (OAI et TFL : $P < 0,05$; LD : $0,05 < P < 0,1$; D : $0,3 < P$ 0,4; CT : $0,8 < P < 0,9$).

L'activité de la fructose-1,6-diP-aldolase, qui caractérise la voie glycolytique du métabolisme énergétique, est plus forte chez les culards (CT, OAI, LD : $P < 0,05$; D, TFL : $0,05 < P < 0,1$).

Cette étude confirme, en termes biochimiques, l'existence d'une hyperplasie cellulaire dans les muscles des culards (ASHDOWN, 1959; OUHAYOUN *et al.*, 1964; Mc KELLAR, 1968) et étaye l'hypothèse selon laquelle cette hyperplasie serait générale (OUHAYOUN et BEAUMONT, 1968). L'accroissement du métabolisme glycolytique relativement au métabolisme oxydatif, décrit par AHSMORE (1969), par voie histoenzymologique, dans les muscles hypertrophiés, semble affecter aussi les muscles iso et hypotrophiés chez les culards.

Étiologie des viandes à pH élevé de ruminants (études sur le mouton)

G. MONIN et P. GIRE

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

Dans toutes les espèces de boucherie la déplétion des réserves glucidiques de la musculature avant l'abattage peut entraîner l'apparition d'un pH élevé dans la viande. Cependant l'étiologie de tels accidents peut varier d'une espèce à l'autre, compte tenu des différences dans le métabolisme énergétique musculaire, en particulier entre Monogastriques et Ruminants.

Des études menées sur le mouton montrent que dans cette espèce il semble que :

— l'obtention d'un pH élevé dans la viande résulte d'une mobilisation excessive du glycogène musculaire plutôt que d'une insuffisance de la resynthèse;

— les agressions d'ordre psychique (peur, modification de l'environnement) sont plus importantes que les agressions de nature physique (comme l'exercice);

— bien que les effets β des catecholamines jouent un rôle prépondérant dans la mobilisation du glycogène musculaire, on ne peut exclure la participation de troubles de la circulation sanguine et du fonctionnement corticosurrénalien.

Étude *in-vitro* de l'action du CAF sur la structure myofibrillaire

C. VALIN et A. OUALI

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

L'incubation du CAF avec des myofibrilles de muscles de bovins au pH optimum de l'activité de cette enzyme se traduit par une augmentation de la solubilité des protéines myofibrillaires et par la destruction de la strie Z.

L'analyse qualitative de l'effet de cette enzyme sur la structure myofibrillaire indique une augmentation de la solubilité de la myosine, la libération de l'α-actine, une libération et une dégradation partielle de la troponine T. Par ailleurs des composés protéiques non identifiés de la structure myofibrillaire voient également leurs propriétés de solubilité modifiées par l'action de cette enzyme.

Le rôle du CAF dans le phénomène de maturation est discuté à partir de ces résultats obtenus *in vitro*.

Protéolyse de viande axénique

J. BOUSSET

Laboratoire de recherches sur la Viande,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Lors de l'étude de la maturation de saucissons secs nous avons constaté que la protéolyse était très variable. Pour connaître la part du phénomène qui pouvait être attribuée aux bactéries et celle qui revenait au substrat, nous avons suivi, sur de la viande d'animaux axéniques, l'évolution de l'azote soluble à l'eau (NS) et de l'azote non précipitable au TCA (NnP).

La viande est prélevée et placée dans des flacons bouchés directement dans l'isolateur. Les analyses sont effectuées après 1, 2, 3 et 4 semaines de conservation à 22 °C. La stérilité est contrôlée par examen direct et après ensemencement sur milieu nutritif.

Dans de la viande de rat adulte, au cours de quatre essais, l'azote soluble (NS) en pourcentage de l'azote total (NT) augmente de 28 p. 100 (18 à 38) l'azote non protéique (NnP) en pourcentage du NT augmente de 133 p. 100 (119 à 149) en un mois. Les valeurs basses et élevées d'augmentation de NS et NnP se correspondent. L'augmentation du NS est sensiblement linéaire pendant toute la période alors que celle du NnP est forte pendant la première et la deuxième semaines puis se ralentit.

Cette protéolyse est beaucoup plus importante que celle constatée dans les saucissons secs. La température de maturation n'est certainement pas le seul phénomène qui intervient pour la limiter puisque, dans un essai à 12 °C, l'augmentation de NS est encore de 14 p. 100 et celle de NnP de 89 p. 100.

Évolution de la température des carcasses à diverses profondeurs dans les installations industrielles de réfrigération rapide

J. DELAUNAY et G. LETANG

Division I.A.A.F. - C.T.G.R.E.F.,
Parc de Tourvoie,
92160 Antony

Actuellement, la réfrigération rapide des animaux de boucherie se développe. Cette technique est le sujet de nombreuses controverses en ce qui concerne sa rentabilité et ses conséquences sur la tendreté des viandes.

La Division des Industries Agricoles du C.T.G.R.E.F. à Antony se propose d'étudier une installation de réfrigération rapide en continu. Cette installation comprend deux locaux en série : un tunnel de refroidissement rapide et une chambre de stabilisation.

L'étude envisagée doit porter sur les points suivants :

— Évolution de la température interne des viandes à plusieurs profondeurs au niveau du globe, des muscles dorsaux et de l'épaule.

— Détermination de la température moyenne des carcasses en fin de réfrigération.

— Perte de masse au cours du refroidissement.

— Consommation énergétique et coût d'exploitation de l'installation.

L'expérimentation sera répétée sur des animaux d'âge et d'état d'engraissement différents.

Plusieurs régimes d'application du froid définis par la température et la vitesse de l'air dans le tunnel de refroidissement rapide seront mis en œuvre.

Le cisaillement des viandes

P. SALÉ

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

L'évaluation de la tendreté des viandes fait souvent appel à des méthodes de cisaillement. Compte tenu de la structure anisotrope et hétérogène du muscle, le cisaillement est toujours une opération complexe qu'il est nécessaire d'analyser en détail pour pouvoir interpréter correctement les divers paramètres pris en considération.

Après avoir décrit un appareil récemment réalisé, on étudie l'influence de la géométrie du dispositif de cisaillement, de la vitesse de cisaillement et du temps de réponse des appareils de mesure associés, sur les conditions de cisaillement et sur la force de cisaillement. Le comportement des viandes crues et cuites est analysé en fonction des résultats obtenus sur divers types de matériaux.

comparaison de deux méthodes d'évaluation de la tendreté

C. TOURAILLE

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

Nous avons comparé les résultats obtenus grâce à deux appareils d'évaluation de la tendreté opérant par cisaillement et par écrasement, avec ceux obtenus grâce au jury de dégustateurs. L'expérience a porté sur 6 muscles, présentant une large gamme de variation de tendreté, prélevés sur une cinquantaine d'animaux.

Les mesures mécaniques ont été effectuées sur la viande crue; le jury pour sa part a apprécié la tendreté après une cuisson sous forme de « fondue bourguignonne ».

Les résultats montrent que :

— Dans les 2 cas (cisaillement et écrasement), la Force est mieux corrélée à l'impression de tendreté que le Travail.

— En ce qui concerne l'écrasement, il est souhaitable d'effectuer un taux de déformation maximum.

— Pour le cisaillement on constate que l'épaisseur initiale des échantillons doit être voisine de 1 cm.

— La relation Force de cisaillement — jury a un meilleur coefficient de corrélation que la relation Force d'écrasement — jury (0,83 contre 0,80).

Variation de la force de cisaillement des muscles de bovins; conséquences sur la catégorisation des morceaux

B. L. DUMONT

Laboratoire de recherches sur la Viande,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

On a étudié la valeur absolue des forces de cisaillement à l'appareil de Warner Bratzler d'un ensemble de neuf muscles crus provenant d'un échantillon de carcasses de bovins (N = 67) regroupant différents types de production (femelles, mâles castrés et mâles entiers). Les muscles étudiés étaient les suivants : *Psoas, Adductor, Longissimus dorsi, Teres major, Splenius, Rhom-*

boideus, *Semitendinosus*, *Pectoralis profundus* et *Triceps brachii pars laterale*. Les valeurs des forces ont permis de déterminer intracarcasse un classement de tendreté décroissante des différents muscles et, au niveau de l'ensemble de la population un classement des muscles, d'après la valeur du rang moyen occupé dans l'échelle des tendretés. Les résultats montrent que :

1) la dureté de chaque muscle est très variable (les coefficients de variation intraéchantillon vont de 32,6 pour le *Semitendinosus* à 44,3 pour le *Teres major*);

2) le classement en rang de tendreté décroissante est aussi très variable; la variabilité est d'autant plus grande que le muscle est plus tendre : ainsi le rang moyen du *Psoas* est de 1,75 (cv 53,7 p. 100) alors que celui du *Triceps brachii pars laterale* est de 8,12 (cv 14,9 p. 100);

3) les forces de cisaillement sont souvent peu ou pas significativement différentes d'un muscle à l'autre.

Selon les animaux le niveau absolu et relatif de tendreté est donc très variable, ce qui amène à discuter et à mettre en question le bien-fondé de la catégorisation générale des morceaux actuellement employée qui repose exclusivement sur l'origine anatomique de la viande mise en vente.

Un autre essai portant sur un effectif plus limité d'animaux (N = 34) mais sur 12 muscles (les muscles du premier essai, plus les muscles *Infraspinatus*, *Triceps brachii caput longum*, *Supraspinatus*) aboutit aux mêmes conclusions.

Cuisson de la viande : tendreté et pertes de poids

A. LAROCHE

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

A quelques exceptions près, la viande est consommée après une cuisson industrielle ou ménagère qui modifie ses caractéristiques organoleptiques. Pour définir cette transformation, il faut considérer le temps, la température et le mode de chauffage ainsi que les caractéristiques du morceau et pour effectuer des analyses physico-chimiques sur la viande cuite, il faut que l'on puisse admettre l'homogénéité du traitement.

En utilisant des tests imitatifs d'évaluation de la tendreté, dans le cas de cuisson dans l'eau, le muscle *Longissimus dorsi* peut présenter une résistance mécanique plus importante que le muscle *Pectoralis profundus*. Pour ce muscle, après une cuisson de 4 h à l'eau bouillante, les forces les plus faibles sont obtenues à partir des échantillons crus les plus résistants. Ces résultats peuvent être expliqués par analogie avec le comportement mécanique de protéines végétales filées enrobées de gélatine.

Les pertes de poids augmentent lorsque le temps ou la température de chauffage augmente, mais en plus des paramètres de cuisson, il faut considérer la géométrie de l'échantillon. En effet, l'eau est « libérée » sous l'action de la chaleur et diffuse hors de l'échantillon en entraînant des composés solubles en quantité non négligeable.

Il ne faut pas perdre de vue l'ampleur du concept de cuisson qui fait que les données dans ce domaine ne peuvent être que très parcellaires.

Contribution à l'étude des facteurs inflencant la stabilité thermique des collagènes musculaires : Effet du pH de la concentration saline et de la nature des ions

J. KOPP

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

La technique de mesure de la contraction isométrique des fibres de collagène lors du chauffage soit en gradiant de température soit à température constante a été utilisée pour étudier la stabilité thermique des collagènes musculaires.

Le principe de cette méthode consiste à équilibrer les fibres (préalablement séchées à l'acétone) dans le milieu à étudier puis de les soumettre dans des conditions isométriques à un traitement thermique et de suivre la tension développée par les fibres (contraction et /ou relaxation).

Le chauffage avec variation linéaire de la température en fonction du temps permet de déterminer les températures critiques (contraction, début de relaxation, gélification) et l'amplitude de la contraction. Le chauffage à température constante (choc thermique) permet plus précisément d'étudier les effets de la température et du temps sur la stabilité physique des fibres (contraction maximale, vitesse de relaxation...).

Le comportement des collagènes musculaires (porc et bovin) dans différents milieux a été étudié par cette méthode et quelques aspects sur les effets du pH, du sel et de la température sont rapportés dans la communication.

Aptitudes à l'emploi des viandes de porcs mâles

B. DESMOULIN et M. BONNEAU

Station de recherches sur l'Élevage des Porcs,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

La production des viandes de porcs mâles non castrés est obtenue avec un rendement accru de 10 à 20 p. 100 de l'utilisation des protéines alimentaires. Les limites d'utilisation des viandes mâles, correspondant à leurs aptitudes à l'emploi, résultent d'une procédure de contrôles des risques sexuels à différents niveaux :

— le dosage de la teneur en androstènone des graisses prélevées par biopsies *in vivo* puis sur la carcasse;

— les tests olfactifs pratiqués lors du chauffage rapide des graisses à 150 °C puis lors de la cuisson des viandes mâles;

— enfin, les enquêtes d'acceptabilité des produits distribués, en frais ou après transformation, dans des familles de consommateurs.

Les travaux en cours avec la société OLIDA-CABY d'une part et avec le C.T.S.C.C.V. d'autre part, visent à déterminer les conditions d'acceptabilité des viandes mâles en fonction des caractéristiques technologiques des produits et de leur mode de consommation.

Les sessions d'un groupe de travail, constitué dans le cadre de la C.E.E., devront permettre d'élaborer une nouvelle réglementation de la production et de l'utilisation de ces viandes.

Contribution à l'étude des caractéristiques 1-chimiques et 2-physiques des pâtes fines en fonction du temps de cutterage

J. P. GIRARD

Station de recherches sur la Viande,
Centre de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

1. En cours de cuttérage, on constate de visu que la couleur de la pâte s'éclaircit, à l'appui de ce fait la valeur de la coordonnée trichromatique Y augmente ainsi que celle de la réflectance, mesurée à 525 nm, point isobestique des 3 formes : myoglobine, metmyoglobine, oxymyoglobine. Les altérations des caractéristiques chimiques sont de deux ordres : formation de metmyoglobine $\left(\text{rapport } \frac{K}{S}\right)$, oxydation de la fraction lipidique (test à l'acide thiobarbiturique). L'utilisation du cutter sous vide ne permet de pallier qu'imparfaitement ces altérations.

2. Les temps d'homogénéisation des différents constituants sont de l'ordre de 1 à 2 min (vitesse de rotation des couteaux 2 500 R.P.M.). Ces temps n'ont rien de commun avec ceux de la pratique industrielle (5 à 10 min). Par suite, le but recherché lors du cuttérage est bien de structurer le mélange, viande, gras, eau.

La structure de la pâte est évolutive tout au long de ce processus. Nos mesures de densité, température, constante diélectrique, etc..., nous ont permis de distinguer 2 grandes périodes correspondant à l'établissement d'une structure primaire (sous-cuttérage) et d'une structure secondaire (sur-cuttérage). Le temps optimum de cuttérage, correspond à la transition entre ces deux structures et au maximum de rendement à la transformation.

En cours de cuttérage, notre étude de distribution en taille des particules de gras nous a permis de vérifier que ces particules se distribuent de manière homodispersée (population unique centrée autour de la valeur 10 microns) conforme en cela à la structure d'une émulsion. Ce fait nous autorise à penser que les protéines viandes assument un rôle d'émulsifiant au cours du processus de cuttérage, rôle contreversé et contesté particulièrement par les auteurs allemands.

Influence de la teneur en nitrite résiduel sur la stabilité de la couleur du jambon de Paris

R. GOUTEFONGEA

Station de recherches sur la Viande,
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

A la suite des nombreux travaux réalisés ces dernières années sur les possibilités d'apparition de nitrosamines dans les produits carnés, on semble s'orienter vers une réduction des taux de nitrate et/ou nitrite employés dans ces fabrications. Une telle modification aura parmi ses conséquences de diminuer le taux de nitrite résiduel dans ces produits.

Le but du travail ici décrit est d'étudier si la teneur en nitrite résiduel a une influence sur la stabilité de la couleur du jambon tranché et conservé sous vide, de manière à prévoir si l'abaissement systématique des taux de nitrite résiduel aurait des conséquences sur la stabilité de ce produit.

Sur 190 jambons de Paris dont les teneurs en nitrite résiduel variaient de 3,4 à 125,5 µg/g, on a prélevé sur le muscle *Rectus Femoris*, lors du démoulage, 3 tranches de 0,5 cm d'épaisseur qui ont été immédiatement mises sous vide (10 mm Hg) en sachets transparents.

Les spectres de réflectance ont été établis sur chaque échantillon respectivement dans les 4 heures qui ont suivi la mise sous vide et au bout d'un stockage de 15 jours à + 10° à l'obscurité et à la lumière.

A partir des spectres on a déterminé un certain nombre de caractéristiques de la couleur (Y = luminosité, λd = longueur d'onde dominante, Pe = pureté d'excitation et U.V.W. = coordonnées trichromatiques CIE 1964 à partir desquelles on peut déterminer ΔE différence de couleur).

Les comparaisons de moyennes effectuées pour chacune de ces caractéristiques entre les valeurs initiales et celles obtenues après stockage ainsi qu'entre les valeurs obtenues avec ces deux modes de stockage montrent que les différences, même lorsqu'elles sont significatives (ΔE, λd, Pc) sont de très faible amplitude. En outre, les coefficients de corrélation calculés entre la teneur résiduelle en nitrite d'une part et les différences observées sur les caractéristiques de couleur d'autre part ne sont pas significatifs à l'exception d'un seul (entre la teneur résiduelle en nitrite et ΔE entre stockage à la lumière et à l'obscurité $r = 0{,}3$).

Dans nos conditions expérimentales, la couleur du jambon cuit évolue donc très peu et cette faible évolution n'est pratiquement pas reliée à la teneur en nitrite résiduel.

Quelques trouvailles histologiques dans le contrôle des produits carnés

Ch. LABIE

Laboratoire de recherches de la Chaire d'Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale, École Nationale Vétérinaire, Chemin des Capelles 31076 Toulouse

En France, le contrôle de la qualité des produits carnés ne fait pas suffisamment appel aux possibilités de l'analyse histologique, alors que cette méthode apporte des informations « irremplaçables » et complémentaires de celles de l'analyse chimique.

La méthode histologique utilisée au Laboratoire d'H.I.D.A.O.A. de l'E.N.V. Toulouse pour le contrôle des produits carnés est une méthode simple avec coloration en un seul temps :

— fixation des prélèvements au formol, à 10 p. 100,

— inclusion et coupes à la paraffine,

— coloration de LILLIE-PASTERNAK, à l'éosinate d'azur de méthylène (à pH fonction de celui de la denrée),

— examen microscopique en fluorescence pour l'étude des structures collagéno-élastiques.

Au cours de l'analyse de divers produits carnés, l'examen histologique systématique a permis de découvrir quelques « anomalies » qui avaient échappé à l'analyse chimique de routine :

— incorporation de *protéines végétales texturées* dans des conserves de corned-beef,

— incorporation d'une proportion anormalement élevée de « *déchets tendino-aponévrotiques* » dans des mortadelles dont le rapport collagène/protéines est cependant normal,

— incorporation de déchets conjonctifs et élastiques dans les jambons moulés, après barattage.

Ces quelques exemples illustrent l'intérêt de l'analyse histologique des produits carnés pour découvrir des « fraudes légales » qui ne pourraient être mises en évidence que par des méthodes analytiques longues et complexes (analyses sérologiques en particulier).

Incidence du mode de fabrication de divers types de produits carnés sur les valeurs limites de l'activité de l'eau : signification du point de vue conservation

C. BARRAUD*, J. BILLON*, M. HENRY ** et J. PANTALEON **

* *Laboratoire Central des Établissements Olida et Caby, 114, rue Baudin, 92300 Levallois*

** *Laboratoire central d'Hygiène alimentaire-Ministère de l'Agriculture, 43, rue de Dantzig, 75015 Paris*

Après avoir indiqué la technique de mesure de l'Aw qui leur semble la mieux adaptée pour les produits carnés, les Auteurs ont choisi divers types de ces produits et fixé les valeurs limites trouvées pour chacun d'eux.

L'Aw apparaît comme un indice fondamental de la capacité des produits carnés à se conserver, elle conditionne la prolifération des microorganismes en leur sein et/ou à leur surface, ainsi que les possibilités d'échanges hydriques avec l'environnement.

Le type de fabrication joue évidemment un rôle essentiel dans l'abaissement de la valeur initiale de l'Aw de la matière première.

Le type de conditionnement de la viande ou du produit fabriqué influe également, les modifications de l'Aw seront beaucoup moins importantes pour les produits carnés emballés sous pellicule plastique ou métallique, imperméable à l'eau.

Enfin outre l'action indirecte sur le développement des microorganismes, l'Aw joue un rôle sur l'évolution des phénomènes de rancissement car il a été montré que l'activité lipolytique des lipases microbiennes et tissulaires est différente à mesure que les valeurs de l'Aw diminuent.

Étude de la conservation sous vide des viandes de lapin

C. VALIN*, C. TOURAILLE*, Roberte LAURET ** et Jeanne FOURNAUD **

* *Station de recherches sur la Viande,*
Centre de recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont
** *Laboratoire de recherches sur la Viande,*
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Après six semaines de conservation sous vide à 0 °C de carcasses de lapin on observe :

— des pertes de poids relativement limitées,

— une protéolyse qui entraîne une augmentation régulière de la teneur en acides aminés libres dans la viande,

— la déphosphorylation des nucléotides, intense au cours des quatre premières semaines de conservation , n'affecte que 50 p. 100 des nucléotides acido-solubles totaux après six semaines de stockage,

— la désamination avec libération d'NH_3 reste limitée, même après six semaines de conservation,

— un faible développement de la flore lactique qui n'arrive pas à dominer les bactéries putréfiantes.

L'analyse sensorielle indique qu'après quatre semaines de conservation le sous-vide conduit à l'obtention d'une viande comparable à une viande fraîche quatre jours *post-mortem*. Par contre après six semaines de conservation le produit frais est préféré à la viande conservée sous vide.

Influence du nitrite, de l'ascorbate de sodium et du GDL sur les produits de charcuterie

Jeanne FOURNAUD et Michèle AYROULET-MARTIN

Laboratoire de recherches sur la Viande,
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas

Le nitrite de sodium, à la concentration de 0,6 p. 100 ralentit le développement microbien dans les saucisses de Toulouse, essentiellement dans le cas d'une conservation à 4 °C pendant 7 jours à l'air; la dose de 0,3 p. 100 se trouve être beaucoup moins inhibitrice, le remplacement du nitrite par le nitrate n'apparaît valable que pour une conservation de 14 jours sous vide. Le GDL ou le mélange GDL et ascorbate n'influent pas sur la croissance microbienne en conservation de 14 jours sous vide mais l'inhibent en présence de nitrite si le produit est stocké 7 jours à l'air ou en absence d'air. Du point de vue statistique, la meilleure conservation des saucisses de Toulouse est obtenue pour une conservation de 7 jours sous vide en présence de 0,6 p. 100 ou 0,3 p. cent de nitrite de sodium ou bien 7 jours à l'air, mais avec addition de 0,6 p. 100 de nitrite et de GDL.

Action de l'ozone dans la conservation des produits carnés

J. BILLON

Service de Microbiologie-Laboratoire central d'Hygiène alimentaire,
43, rue de Dantzig,
75015 Paris

Après une étude préliminaire comportant l'action de l'ozone sur des souches pures de *Salmonella typhi murium*, *Salmonella dublin* et *Staphylococcus aureus*, les diverses applications de l'ozone sont envisagées pour son emploi dans la conservation des produits carnés.

L'ozone utilisée seule ou en association avec le rayonnement ultra-violet permet une action bactériologique et même bactéricide sur les souches citées plus haut. Les temps d'action ont été précisés.

L'emploi de l'ozone peut être envisagé pour prolonger la durée de stockage en réfrigération ainsi que pour assurer la désinfection des véhicules servant au transport des viandes, et celle du matériel et des instruments utilisés pour leur transformation.

D'après les premiers résultats obtenus il semble bien que, contrairement à ce qui se passe avec les rayons U.V., l'ozone ne modifie pas l'antibiorésistance des souches microbiennes sur les germes ayant échappé à son action.

Multiplication des *Salmonella* dans la viande hachée - premiers résultats

M. CATSARAS

Centre d'Enseignement et de recherche de Bactériologie des Aliments (.C.E.R.B.A.),
Institut Pasteur de Lille,
Domaine du CERTIA,
369, rue J.-Guesde,
59650 Villeneuve d'Ascq

Le problème de la multiplication des *Salmonella* dans une denrée alimentaire et celui de sa recherche dans cette denrée, a été expérimentalement étudié, en utilisant, au cours d'un premier essai : la viande hachée de bovin, 1 souche de *Salmonella typhi murium* et la température de 10 °C pour l'évolution, pendant 7 jours, de cette souche par rapport à la flore aérobie totale. Les premiers résultats obtenus semblent montrer que les conceptions, relatives aux conséquences tirées de la négativité des recherches de *Salmonella* dans les denrées alimentaires, pourraient devoir être fondamentalement révisées. Des études plus approfondies — bien évidemment nécessaires — sont programmées.

La commercialisation de la viande sous vide dans le Sud-Ouest

L. MAZENC

Laboratoire d'Économie rurale, I.N.R.A.,
Faculté de Droit,
Place Anatole France,
31000 Toulouse

Constatations résultant d'une enquête directe réalisée auprès de 130 « détaillants » : boucheries classiques, formes modernes de distribution, restaurants et collectivités.

Bien que commercialisée depuis assez longtemps, la viande sous vide garde les caractéris-

tiques d'un « produit nouveau » pour le Sud-Ouest. Et, quoique répondant à une clientèle nombreuse, il ne concerne qu'une faible part du marché de la viande de bœuf (nettement moins de 10 p. cent).

Mais pour des raisons techniques, psychologiques, juridiques et économiques (réelles ou supposées dans ce dernier cas) sa commercialisation se fait dans des proportions différentes suivant les clients : Restaurateurs privés et grandes surfaces l'acceptent beaucoup mieux que bouchers traditionnels et collectivités.

Dans tous les cas « favorables » c'est essentiellement un produit qui permet de se libérer d'une contrainte de main-d'œuvre, et alors il est concurrencé par le désossé frais.

Influence de la méthode de nettoyage de la nature du désinfectant sur la propreté microbiologique du bois et du plastique

Jeanne FOURNAUD* et J. LEMAIRE**

** Laboratoire de recherches sur la Viande,*
Centre national de recherches zootechniques, I.N.R.A.,
78350 Jouy-en-Josas
*** École Supérieure des Métiers de la Viande,*
37, boulevard Soult,
75012 Paris

Deux techniques de nettoyage sont comparées : A, lavage par brossage et solution chaude d'un détergent; B, lavage à l'aide d'une lavette et d'une solution d'eau tiède. La propreté visuelle apparaît bonne quelle que soit la méthode et le matériau testé. Cependant, au plan microbiologique, les résultats diffèrent; le meilleur s'obtient par la technique A appliquée au hêtre stratifié ou au bois couché; le moins bon se produit pour la technique B utilisée sur le bois couché. Sur le matériau plastique, les deux méthodes de nettoyage entraînent, du point de vue statistique, une diminution équivalente du nombre de bactéries, diminution proche de celle observée sur le bois couché. Parmi les désinfectants, l'hypochlorite de sodium détruit, dans les conditions utilisées, le plus grand nombre de microorganismes.

Quelques résultats du contrôle bactériologique des plats cuisinés à l'avance

M. JOUVE

Chaire d'Hygiène et Industrie des Denrées d'origine animale,
École Nationale Vétérinaire,
94701 Maisons-Alfort

La fréquence toujours croissante de la consommation des plats cuisinés à l'avance a provoqué, de la part des pouvoirs publics, la mise au point de dispositions strictes relatives au contrôle de leur valeur hygiénique et notamment de leur qualité bactériologique.

Nous nous sommes appliqués à recueillir dans des conditions très précises 131 échantillons de plats cuisinés à l'avance, à en contrôler la composition et à en déterminer la teneur en germes microbiens par application des techniques bactériologiques définies en annexe de l'arrêté ministériel du 26 juin 1974.

L'on a pu remarquer avec satisfaction l'absence de salmonelle et de staphylocoque enterotoxique dans les échantillons analysés.

Par contre 8,3 p. 100 des plats préparés renfermaient des germes de contamination fécale et 20,9 p. 100 des germes aérobies mésophiles totaux à des taux supérieurs aux normes.

Il est possible, à partir de ces observations d'établir les relations entre les caractéristiques microbiologiques des plats et divers paramètres importants du point de vue de l'hygiène : nature et provenance des matières premières, conditions de conservation des plats, pratiques culinaires telles que l'emploi ou non de sauces et d'ingrédients modifiant les caractéristiques physico-chimiques du produit préparé, notamment son pH.

De telles observations, dont certaines appelleraient confirmation, doivent être prises en compte pour la mise en œuvre de mesures prophylactiques adéquates.

(N.B. — Ce travail fera l'objet d'une thèse pour le Doctorat Vétérinaire de M. Marc LEGRAND).

Analyse de l'évolution récente du secteur de la transformation des viandes

Maïté ERRECART

Laboratoire d'études économiques sur les I.A.A., I.N.R.A.,
3, rue du Caducée,
94153 Rungis

L'observation du secteur réalisé au cours d'une enquête exhaustive auprès de tous les agents qui ont traité annuellement plus de 1 000 t de viande de boucherie permet de clarifier les appréciations contradictoires qui sont portées sur le plan de l'évolution du secteur de la transformation pes viandes.

— Sur le plan des structures, trois évolutions semblent prééminentes :

- la concentration qui se traduit par la disparition de certains agents et l'accroissement de la taille de ceux qui restent. Ainsi, en viande bovine, si en 1972, on comptait seulement 5 entreprises qui dépassaient les 10 000 t et représentaient 11 p. 100 du marché, en 1976, elles sont au nombre de 18 et représentent 27 p. 100 du marché,
- la percée des entreprises à capitaux professionnels agricoles. Cette percée se mesure en part de marché 22 p. 100, mais aussi et surtout du fait que nombre d'entreprises leaders au niveau national mais aussi au niveau des régions sont de nature coopérative,
- les difficultés d'adaptation d'une génération d'agents du commerce en gros. Entreprises familiales pour l'essentiel, elles étaient bâties sur un savoir-faire commercial simple. Or, la concurrence s'est élargie de même que le champ des compétences et des moyens financiers nécessaires.

La résultante de ces évolutions reste néanmoins et encore une atomisation du secteur (plus de 650 agents travaillaient en 1976 1 000 t et plus de viande de boucherie) et la non entrée de capitaux externes à l'agro-alimentaire.

— Sur le plan des fonctions, l'évolution se caractérise par un double mouvement d'intégration de fonctions traditionnellement externes au secteur et une disjonction de celles exercées au niveau interne.

C'est ainsi que globalement, le secteur de gros assure de plus en plus directement la collecte en ferme des animaux, et à l'autre extrême, la fonction bouchère de découpe et de 1/2 gros (420 000 t de gros bovins découpées en 1976 par le secteur de gros). Au niveau des agents par contre, s'est développée une spécialisation sur des opérations par exemple — abattage-expédition d'un côté, distribution de foraine de l'autre.

Ces changements, loin d'être terminés semblent devoir s'accélérer sur les prochaines années, l'effet des variations du cycle de production et donc des prix s'accentuant.

Comportement de consommation de viande selon les groupes sociaux

P. SAUNIER

Station d'Économie et Sociologie rurales, I.N.R.A.,
6, passage Tenaille,
75014 Paris

Bien qu'elle soit parfois délaissée au profit d'autres paramètres (par exemple, l'opposition entre comportements ruraux et comportements urbains), la notion de Catégorie Socio-Professionnelle (CSP) permet d'expliquer une bonne partie des comportements alimentaires, notamment si on recourt à une classification plus détaillée que celle qui est en usage (i.e. 8 ou 11 CSP).

Dans le cas de la viande, les écarts de consommation entre CSP sont sensibles. Toutes viandes confondues, les différences de dépenses (par personne) vont presque du simple au double, les quantités consommées varient de 1 à 1,6 (de 1 à 2 pour l'ensemble des viandes de boucherie), les prix de 1 à 1,5.

Ces écarts qui s'expriment également dans la diversité des structures de consommation ne sauraient être réduits à une seule explication et interprétés de façon univoque. Ils sont la conséquence de différences dans le mode de vie (type d'activité et type de travail exercés), de différences d'ordre économique (niveaux du revenu), de différences d'ordre culturel.

Cependant, aucune de ces explications ne peut être considérée isolément. C'est ainsi, par exemple, que pour expliquer les préférences alimentaires des cadres il est tout à fait arbitraire de séparer ce qui relève de leur stratégie économique dans la gestion du budget viande (et plus généralement dans la gestion du budget alimentaire) de ce qui provient de leur « culture nutritionnelle » et de leurs habitudes « diététiques ».

C'est pourquoi les comportements alimentaires des divers groupes sociaux se modifient assez lentement comme en témoignant les données comparatives sur les structures de consommation en 1956 et 1972.

Axes de développement de la construction mécanique destinée à la transformation des produits carnés

M. SAUDAN

Institut de la Viande de Clermont-Ferrand,
29, avenue des Landais,
63170 Aubière

L'objectif de cette étude fut de repérer et définir sur le plan technique et économique des pistes possibles de relance de la construction mécanique destinée à la transformation des produits carnés. Commandée par le Ministère de l'Industrie, elle a été réalisée par l'AND * au sein de l'Institut de la Viande. Elle nécessitait en effet, du fait de la méthodologie adoptée, la participation d'industriels de la mécanique et des secteurs viandes (abattage, charcuterie, salaison...), de technologues, scientifiques et économistes.

Méthodologie

L'étude a été conduite en 3 étapes :

1. *Phase préliminaire*

Pour les principaux types de produits (carcasses, pièces, salaisons...) ont été établis des diagrammes de fabrication (flow-sheet) en terme d'opérations unitaires. Chaque opération unitaire

(*) Association Nutrition Demain.

a été ensuite analysée pour préciser ses caractéristiques en terme de génie alimentaire, son mode de réalisation avec le cas échéant les types de matériels.

2. *Repérage des opportunités techniques et économiques*

Les opportunités techniques ont été détectées par confrontation des possibilités techniques issues des activités de recherche (réunions de chercheurs) et de besoins ou verrous technologiques « limitant » pour l'industrie (réunions d'entreprises « viandes »). Les opportunités économiques ont été mises en évidence par une étude des tendances de la demande (consommation) par produit /par pays puis par analyse des possibilités de réponse à cette demande (potentiel d'évolution et tendances d'investissements). Une vérification de l'intérêt économique des pistes techniques a permis d'aboutir à des créneaux techniques et /ou commerciaux.

3. *Confrontation des créneaux à la capacité des constructeurs nationaux*

Ce tri effectué avec les constructeurs nationaux, a permis de retenir les créneaux les plus accessibles à leurs entreprises compte-tenu de leurs atouts techniques et commerciaux face à la concurrence étrangère.

Résultats

Un certain nombre d'axes de développement a pu êre sélectionné sur deux critères principaux :

- Créneaux techniques liés à la mise au point (amélioration, innovation) de matériels correspondant aux besoins d'activités soumises à un processus actuel d'industrialisation.
- Créneaux économiques dus à des investissements prévisibles (type d'activité ou pays) du fait des tendances de développement des marchés et de capacités de traitements industriels.

Mais des difficultés pour saisir ces opportunités ont aussi été mises en évidence dont en particulier :

— certaines lacunes dans les connaissances technologiques nécessitant la poursuite ou la mise en œuvre de R.D.

— faiblesse des relations « non-commerciales » en fournisseur et utilisateur de matériels,

— manque de cohérence entre les politiques commerciales de certains constructeurs nationaux voire d'ingénierie face à la concurrence étrangère et aux marchés étrangers.

Reçu pour publication en janvier 1978.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1978

Vol. 27 - N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 585-607.

Production de protéines microbiennes à partir de mouture de blé

J. RIVIÈRE, H. HESLOT, M. COUDERT et J. P. DELAGE

avec la collaboration technique de Renée GERMAIN et Christine MICHIEWICZ

Laboratoires de Recherches de la chaire de Microbiologie
et de la chaire de Génétique des Microorganismes,
Institut National Agronomique Paris-Grignon
16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris Cedex 05

Résumé

On a étudié l'action de divers facteurs du milieu (teneur en amidon, nature et concentration de la source d'azote, concentration en corn steep) sur la biomasse et la teneur en protéines de trois souches d'une levure amylolytique (*Endomycopsis fibuligera*). Les résultats de cette expérimentation ont permis d'obtenir des protéines microbiennes en fermenteur à partir de mouture de blé ensemencée avec ces souches en cultures pures ou associées avec une autre (*Candida utilis* et *Candida tropicalis*).

On a pu aussi réaliser une fermentation continue avec deux souches associées (*E. fibuligera-C. tropicalis*). Quand il y a 3 p. 100 de mouture enrichie en corn steep (0,5 p. 100), en sulfate d'ammonium (15 g/l) et en sels minéraux, le gain en protéines présentes dans la matière sèche est de 1,6 g/l (soit 68 p. 100), à condition d'avoir un faible taux de dilution ($D = 0{,}05\ h^{-1}$). La composition en acides aminés des protéines obtenues fait ressortir une teneur élevée en lysine (7,7 p. 100).

Mots clés : *Protéines microbiennes, Production, Mouture de blé, Levures, Fermentation continue, Technologie.*

I. — Introduction

On avait, jusqu'à présent, l'habitude d'évoquer le déficit en protéines dans le cadre de l'alimentation humaine des pays en voie de développement. Les difficultés rencontrées, il y a quelques années, par le secteur de l'alimentation animale, pour assurer son approvisionnement en protéines, ont mis en évidence la nécessité de rechercher des solutions variées à ce problème, même en Europe.

En France, la couverture des besoins de l'alimentation animale est assurée,

pour les trois quart environ, par des tourteaux dont 90 p. 100 sont importés, représentant une quantité non négligeable de devises (A.G.P.B. 1973).

La production de céréales étant importante, les cours fluctuants, on a envisagé d'utiliser l'amidon céréalier comme substrat carboné en vue d'obtenir des protéines microbiennes, ou un produit enrichi en protéines. En effet, la teneur en protéines des céréales est assez faible et leur composition en acides aminés est déséquilibrée par rapport aux besoins des animaux d'élevage monogastriques.

Comme les protéines des levures ont une composition complémentaire caractérisée par leur richesse en lysine et un manque d'acides aminés soufrés, on a envisagé une éventuelle production de ces protéines à partir de mouture de blé; d'autant plus que de nombreuses expérimentations zootechniques ont démontré la valeur nutritionnelle de ces aliments azotés (KIHLBERG, 1972).

Des levures amylolytiques appartenant au genre *Endomycopsis* ont été décrites dès 1956 par WICKERHAM et KUEHNER. Plus tard, on a mis au point, en Tchécoslovaquie, divers procédés permettant d'obtenir des protéines de levures (*Endomycopsis fibuligera*) destinées à l'alimentation du bétail, à partir d'amidon (BACOVA *et al.* 1968; POLIKVA et ZELINKA, 1969). Cette espèce peut aussi se développer sur des résidus de pâtes alimentaires (LACHANCE et BLACKWOOD, 1972).

Pour avoir une teneur en protéines plus élevée, on a associé deux souches, la première hydrolysant l'amidon (*E. fibuligera*), la seconde (appartenant au genre *Candida*) utilisant les produits d'hydrolyse comme substrat carboné (WICKERHAM et KUEHNER 1956). En Suède, cette technique a été développée industriellement par la SVENSKA SOCKERFABRIKS AKTIE BOLAGET pour donner un procédé continu de production de protéines unicellulaires à partir de divers substrats amylacés, le procédé Symba (TVEIT, 1963; JARL et TVEIT, 1963; JARL, 1969). Ce procédé est actuellement utilisé pour l'épuration d'eaux résiduaires contenant de l'amidon (WIKEN, 1972). En ce qui concerne les céréales, un procédé australien utilise l'amidon comme substrat de fermentation par les levures, après avoir extrait le gluten (MC LENNAN, 1974).

Toutes ces raisons nous ont conduits à l'étude de la production de protéines microbiennes à partir de mouture de blé en utilisant diverses souches de levures amylolytiques seules (*Endomycopsis fibuligera*) ou associées (*Candida sp.*).

II. – Matériel et méthodes

2.1. — *Origine des souches*

Les souches utilisées, ainsi que leur origine, sont indiquées dans le tableau 1.

Ces souches sont conservées à 4 °C dans un gel de silice de la manière suivante: après deux ou trois jours de croissance à la surface d'un milieu nutritif gélosé, on prélève les cellules que l'on met en suspension dans du lait stérilisé. On ajoute 2 ml de cette suspension à 2,5 ml de silice préalablement stérilisée à 180 °C.

2.2. — *Milieux de culture*

Leur composition est donnée dans le tableau 2.

Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu de base à pH 4,5 filtré à chaud après ébullition. Deux sources d'azote ont été choisies : sulfate d'ammo-

TABLEAU I

Origine des souches utilisées

Endomycopsis fibuligera	1. CBS(*) 2521 2. CBS(*) 2522 3. CBS(*) 2523 4. CBS(*) 2524 5. CBS(*) 2525 6. CBS(*) 2527 7. CBS(*) 2551 8. CBS(*) 2553 9. CBS(*) 5290 10. CBS(*) 5551 11. CBS(*) 5843 12. CBS(*) 6266 13. CBS(*) 6310 14. CBS(*) 6338 16. CBS(*) 5158 34. 73.34 MA Lachance(**) 36. 73.36 MA Lachance(**)
Saccharomyces diastaticus	15. CBS(*) 1782
Candida utilis	ATCC 9950
Candida tropicalis	ME 50 (Laboratoire de Génétique I.N.A.-P.G.)

(*) Delf.
(**) Food Science and Technology. University of California, Davis, California. 95616.

nium ou urée, cette dernière stérilisée séparément à l'aide de filtres Millipore (HAWP — 0,45 μ) et ajoutée au milieu préalablement stérilisé. Le substrat amylacé (amidon de blé pur, farine entière de blé, mouture Focam ou mouture de blé ITCF) est ajouté au milieu de base froid que l'on porte ensuite à ébullition pendant trois minutes en agitant constamment. Bien que l'extrait de levure puisse servir de facteur de croissance à toutes les souches d'*Endomycopsis* éprouvées, on a généralement utilisé du corn steep liquide préalablement traité. Une solution de corn steep à 20 p. 100 est centrifugée 15 minutes à 4 000 trs/min. Le surnageant est alors stérilisé 15 min. à 115 °C, puis stocké à 4 °C. C'est à partir de cette solution que l'on constitue le milieu complet, en ajoutant, après l'amidon, la quantité nécessaire pour obtenir la concentration en corn steep désirée. Le milieu terminé est alors stérilisé 20 min. à 115 °C après avoir été réparti en tubes ou en fioles.

Le dénombrement des cellules revivifiables se fait dans un milieu gélosé glucosé.

Le pouvoir amylolytique est apprécié d'après le diamètre de la zone décolorée obtenue autour d'une colonie incubée 5 jours à 30 °C, la plaque étant recouverte de lugol.

La sporulation a été mise en évidence après examen microscopique des souches ensemencées dans un milieu convenable.

TABLEAU 2

Composition des milieux de culture
(en g pour un litre d'eau distillée)

Milieu de base		Gélosé pour dénombrement		Culture en fiole et en fermenteur		Gélosé pour sporulation		Gélosé à l'amidon	
K_2HPO_4	4,7	Glucose	10	Milieu de base q.s.p. 1 000 ml		Infusion de pomme de terre	200	Milieu de base q.s.p. 1 000 ml	
$MgCl_2, 6H_2O$	0,85	Bactopeptone (Difco)	5	$(NH_4)_2SO_4$	0 à 15	Glucose	20	Amidon soluble	10
NaCl	0,5	Extrait de levure (Difco)	3	Corn steep (à 20 p. 100)	5	Gélose	15	Extrait de levure	2,5
$CaCl_2$	0,05			Amidon ou Mouture ITCF	30 à 50			Gélose	15
$FeCl_3$	0,005	Gélose	15						
Tampon : pH 4,5									
Acide lactique	0,94 ml								
Lactate de sodium à 60 p. 100	10 ml								

2.3. — *Méthodes*

2.3.1. — *Cultures en fioles et en fermenteur*

Une série de cultures a été réalisée dans des fioles de Fernbach de 2 l contenant 200 ml de milieu liquide incubées à 30 °C (table d'agitation LEQUEUX, mouvement alternatif).

On a ensuite utilisé un fermenteur (BIOLAFFITTE, 2 l) contenant 1 200 ml de milieu. L'inoculation se fait à l'aide d'une culture en fiole de 24 h, à raison de 4 p. 100 (v/v). Les conditions de la fermentation (température, aération, agitation) sont maintenues constantes à l'aide du système de régulation automatique BIOLAFFITTE. Le pH est également réglé à une valeur de 4,5 par addition d'acide sulfurique normal.

Pour les fermentations continues, deux pompes péristaltiques sont adjointes à ce système :

— l'une amène au fermenteur le milieu neuf contenu dans un réservoir aseptique agité (fermenteur BIOLAFFITTE, 20 l).

— l'autre prélève continuellement le milieu réactionnel ayant séjourné un temps déterminé dans le fermenteur.

2.3.2. — *Mesure de la croissance*

On peut dénombrer les cellules revivifiables ou déterminer le poids sec de la masse cellulaire.

Dénombrement. On ensemence par étalement à la surface d'une plaque de gélose 0,1 ml d'une dilution appropriée de la culture éprouvée, ce qui permet d'évaluer le nombre de cellules revivifiables dans la culture après avoir dénombré les colonies apparues. Il est possible, de ce fait, de différencier les colonies des deux souches en présence, car elles ont des morphologies différentes.

Détermination du poids sec de la masse cellulaire. Dans le cas d'un milieu à base d'amidon, il faut au préalable éliminer l'amidon résiduel par hydrolyse avant de déterminer la biomasse. Cette hydrolyse est faite à l'aide d'une amyloglucosidase (qui hydrolyse les liaisons 1-4 et 1-6 reliant les molécules de glucose dans la chaîne d'amidon) selon le protocole expérimental suivant :

L'enzyme (amyloglucosidase SIGMA, grade II) est mise en suspension à raison de 100 mg dans 10 ml d'une solution de phosphate monosodique 0,3 M, pH 4,3. Après agitation, cette suspension est filtrée sur Millipore (HAWP 04700 — 0,45 μ). On ajoute à un volume de la culture dont on veut déterminer la biomasse le même volume du filtrat (en général 10 ml). Le mélange est agité pendant trois heures dans un bain thermostaté à 40 °C, puis filtré sur filtre Millipore (HAWP 04700 — 0,45 μ).

Dans le cas d'un milieu à base de mouture de blé, le poids sec est déterminé après 20 min. de centrifugation à 4 000 trs/min. Le culot de centrifugation est lavé deux fois à l'eau distillée, puis séché 24 h dans une étuve à 95 °C. C'est à partir de ces culots de centrifugation séchés que l'on mesure le poids sec et la teneur en azote de la biomasse.

La valeur obtenue représente la biomasse, le son résiduel de la mouture, et éventuellement du gluten et de l'amidon non utilisés par la souche.

2.3.3. — *Déterminations analytiques*

Elles ont consisté à doser l'azote contenu dans la biomasse et le glucose résiduel du filtrat de la culture en fin de fermentation, et à déterminer la composition en acides aminés du produit final.

— *Dosage de l'azote dans la biomasse.*
Le dosage des protéines dans les cellules ne peut être fait par les méthodes colorimétriques du biuret ou de Folin, par suite de la présence de glucides qui interfèrent dans ces deux dosages. On a donc été obligé d'utiliser la méthode de KJELDAHL (NORRIS et RIBBONS, 1971).

— *Dosage du glucose résiduel présent dans le filtrat de culture.* Il a été fait par une méthode enzymatique utilisant la glucose oxydase et la peroxydase (NORRIS et RIBBONS 1971).

— *Détermination de la composition en acides aminés du produit final.* Elle se fait sur le culot obtenu après centrifugation de la culture, par analyse avec un analyseur d'acides aminés (TECHNICON).

— *Dosage des glucides totaux.*
Les glucides totaux sont dosés par la méthode de DUBOIS *et coll.* (1956), modifiée par DRAPON et GUILBOT en 1962 (dosage des glucides par le phénol et l'acide sulfurique).

III. — Résultats et discussion

Ils concernent d'abord le choix des souches amylolytiques que l'on envisage de retenir parmi celles qui ont été éprouvées. Pour ce, il est nécessaire de les différencier, puis de déterminer la biomasse obtenue et la teneur en protéines de chaque souche cultivée dans un milieu liquide synthétique à base d'amidon, avant d'envisager ce qui se passe dans le cas de la mouture de blé.

3.1. — *Choix des souches amylolytiques destinées à la production de protéines*

Différenciation des souches.

Elle concerne la morphologie cellulaire (cellules isolées ou présence de filaments), l'aspect des cultures, la faculté de sporuler (tabl. 3).

Les souches de l'espèce *Endomycopsis fibuligera* donnent, à la surface d'un milieu gélosé, de grosses colonies rugueuses, ayant un aspect étoilé. On distingue des souches filamenteuses (1, 3, 7, 8, 11, 13, 14,) dont les cultures sont visqueuses, alors que d'autres dont la viscosité est du même ordre que celle de l'eau sont constituées uniquement de cellules isolées (6, 9, 12, 34, 36). Le reste des souches éprouvées contient des cultures plus ou moins visqueuses, suivant la proportion de filaments. On observe également des différences dans l'aptitude à sporuler. On constate que la

TABLEAU 3

Caractéristiques des souches (Endomycopsis fibuligera *et* Saccharomyces diastaticus)

Souches	Cellules isolées	Présence de filaments	Aspect des cultures dans un milieu liquide à base d'amidon	Présence d'ascopores	Hydrolyse de l'amidon
E. fibuligera :					
1	—	++	++	+	34
2	+	++	+	—	34
3	+	+	++	+	39
4	+	+	+	—	32
5	+	+	+	+	37
6	++	—	—	—	38
7	—	++	++	—	28
8	—	++	++	—	31
9	++	—	—	—	33
10	+	+	+	—	19
11	—	++	++	—	39
12	++	—	—	—	29
13	—	++	++	+	34
14	—	++	++	+	29
16	++	+	+	+	30
34	++	—	—	+	40
36	++	—	—	—	42
S. diastaticus :					
15	++	—	—	—	0
	— absence + présence de quelques éléments ++ présence de beaucoup d'éléments		— liquide + visqueux ++ très visqueux	— absence + présence	diamètre en mm

souche 15 (*Saccharomyces diastaticus*), non filamenteuse, n'hydrolyse pas l'amidon dans les conditions expérimentales.

En ce qui concerne les besoins en facteurs de croissance, on a utilisé le milieu de base glucosé. Toutes les souches de l'espèce *E. fibuligera* sont auxotrophes pour trois vitamines et un acide aminé, les concentrations optimales dans un milieu synthétique étant les suivantes :

thiamine	5 mg/l
pyridoxine	3 mg/l
biotine	60 mg/l
méthionine	100 mg/l

Ces premiers résultats ont conduit à étudier la croissance de toutes les souches de l'espèce *E. fibuligera* dans un milieu liquide à base d'amidon, en vue de choisir les plus intéressantes comme source de protéines.

Détermination de la biomasse et de sa teneur en protéines dans un milieu liquide à 3 p. 100 d'amidon, réparti en fioles de Fernbach, après 48 h d'incubation à 30 °C.

Les résultats sont résumés dans la figure 1. Ils ont permis de choisir quatre souches ayant chacune des caractéristiques intéressantes et complémentaires (biomasse, teneur en protéines de la biomasse, concentration en protéines du milieu).

Souche 3 : biomasse faible (11,1 g/l), teneur en protéines élevée (41,0 p. 100) culture visqueuse, très filamenteuse, avec 4,55 g de protéines par litre de milieu.

Souche 6 : biomasse élevée (18,1 g/l), teneur en protéines faible (24,1 p. 100) culture liquide, cellules isolées, avec 4,36 g de protéines par litre de milieu.

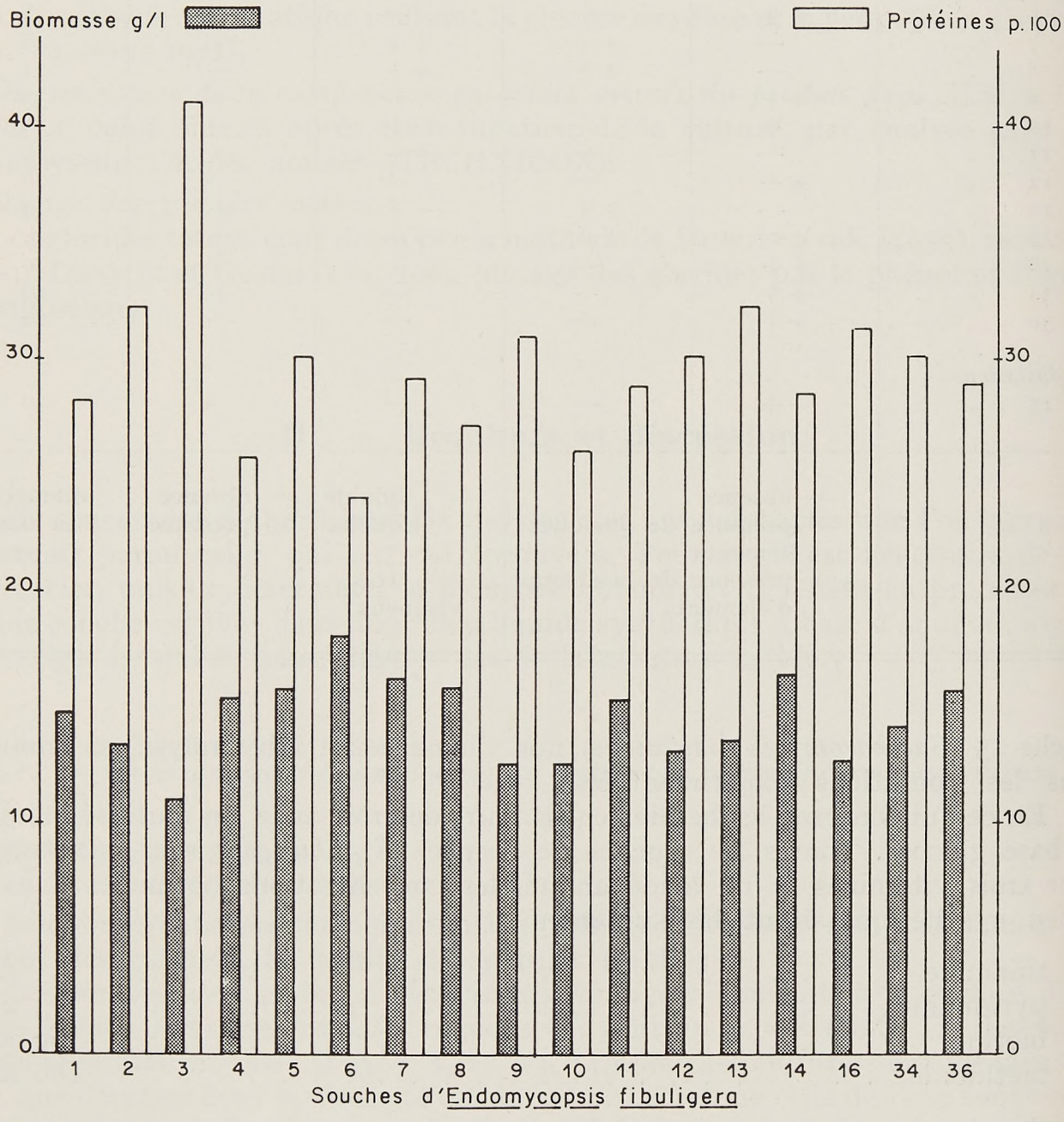


FIG. 1. — *Biomasse et teneur en protéines des 17 souches étudiées* (E. fibuligera) *au bout de 48 heures de culture dans un milieu de base avec 3 p. 100 d'amidon, 15 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 de corn steep, à pH 4,5 (après 48 heures d'incubation à 30 °C)*

Souche 7 : biomasse assez élevée (16,3 g/l), teneur en protéines moyenne (29,2 p. 100), culture visqueuse, très filamenteuse, avec 4,76 g de protéines par litre de milieu.

Souche 34 : biomasse assez élevée (16,2 g/l), teneur en protéines moyenne (30,2 p. 100), culture liquide, cellules isolées, avec 4,89 g de protéines par litre de milieu.

On s'est posé la question de savoir quel est le comportement de ces quatre souches retenues dans un fermenteur.

Étude de la croissance dans un fermenteur

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 2. Les souches 3 et 6 ont de meilleures performances que dans les fioles de Fernbach, la croissance étant aussi plus rapide (la biomasse la plus élevée étant obtenue après 30 ou 40 heures d'incubation).

Dans le cas de la souche 7, dont la culture est très visqueuse, la biomasse est

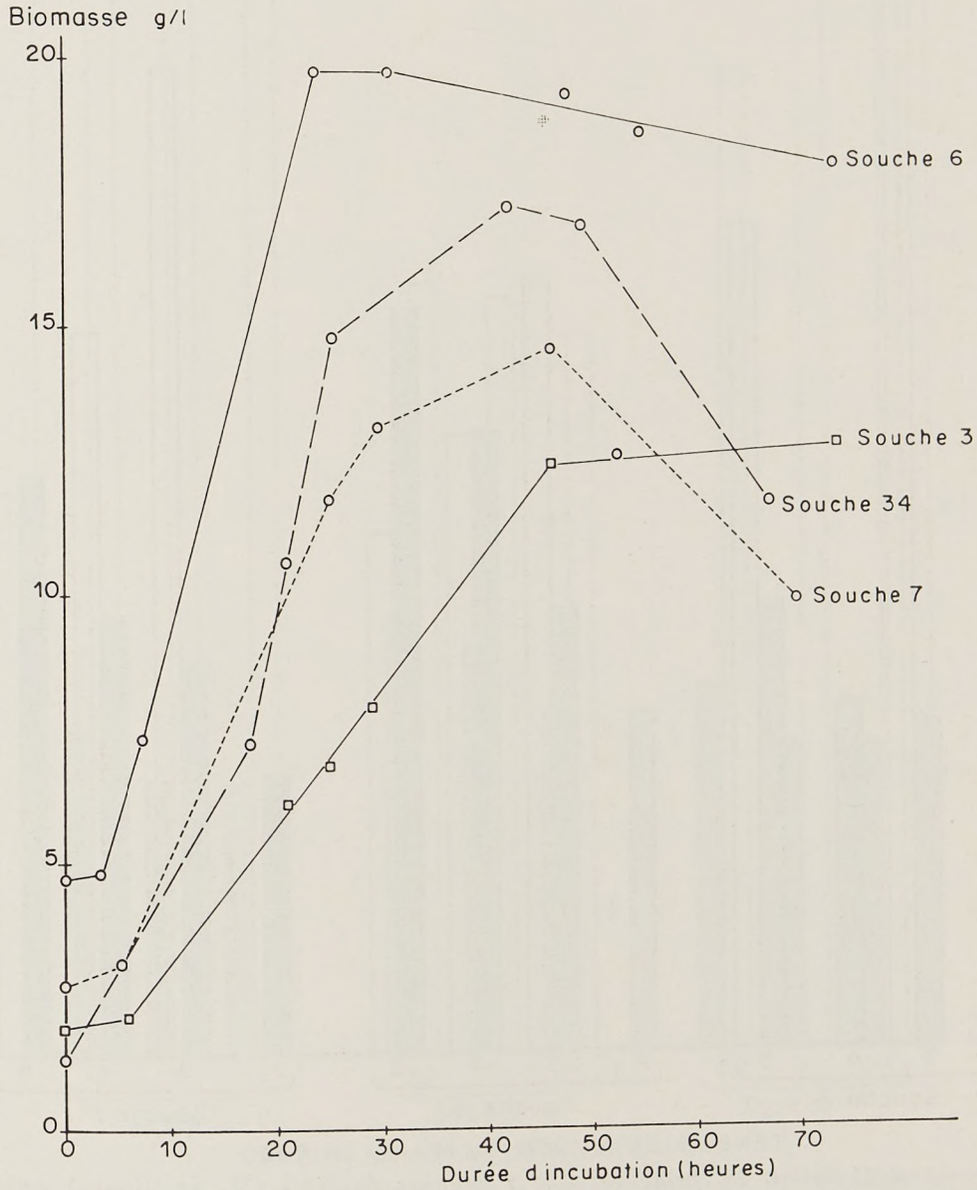


FIG. 2. — *Évolution de la biomasse au cours de la culture dans un fermenteur (2 l Biolaffitte) de quatre souches de l'espèce* Endomycopsis fibuligera *(milieu de base avec 3 p. 100 d'amidon, 15 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 de corn steep, pH 4,5, 30 °C).*

moins élevée. La baisse de rendement en fin de culture ne provient pas d'une lyse des cellules, mais du fait que les filaments se fixent sur les parois du fermenteur, empêchant de réaliser un prélèvement homogène.

Par contre, la souche 34 subit une lyse à partir de la quarantième heure d'incubation, ce qui conduit à ne pas la conserver pour une étude concernant l'action de divers facteurs du milieu sur la croissance dans un milieu à base d'amidon de blé.

3.2. — *Étude de la croissance des 3 souches retenues* (Endomycopsis fibuligera, 3, 6, 7) *dans un milieu à base d'amidon de blé en fonction de divers facteurs*

Cette étude a porté sur la teneur en amidon du milieu, la nature et la concentration de la source d'azote, et la concentration en corn steep (source de facteurs de croissance).

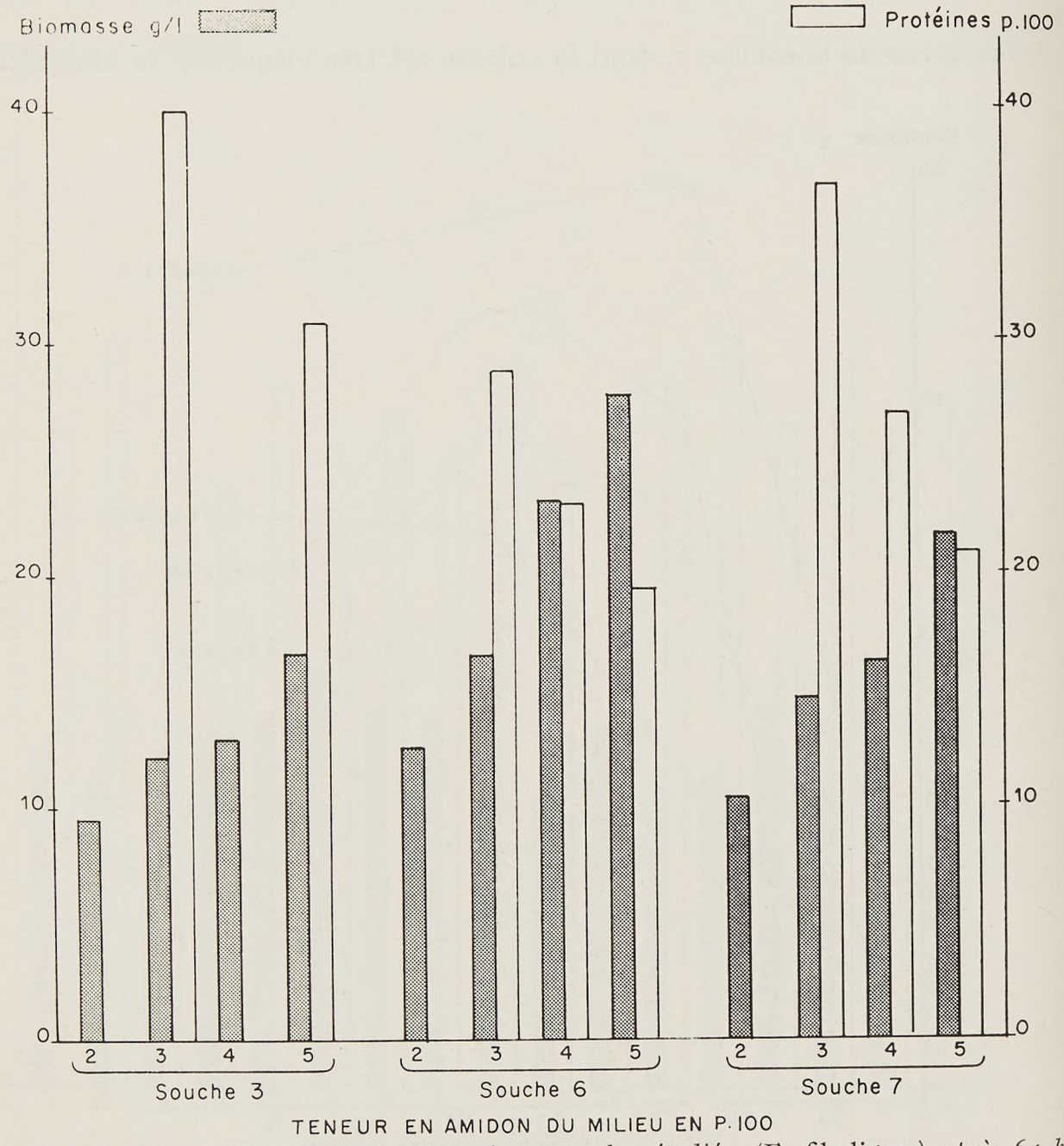


FIG. 3. — *Biomasse et teneur en protéines des 3 souches étudiées* (E. fibuligera) *après 64 heures d'incubation à 30 °C, (ou 88 heures dans le cas de la souche 3 avec 5 p. 100 d'amidon) en fonction de la teneur en amidon du milieu réparti en fioles de Fernbach (milieu de base avec 15 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 de corn steep, pH 4,5).*

Action de la concentration en amidon

Les trois souches ont été cultivées en fioles de Fernbach dans un milieu contenant 15 g/l de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 (v/v) de corn steep et 2, 3, 4 et 5 p. 100 (m/v) d'amidon de blé. Les résultats sont résumés dans la figure 3.

On observe que les biomasses augmentent avec la teneur en amidon du milieu, le maximum étant obtenu après 64 heures d'incubation, sauf dans le cas de la souche 3 où il faut 88 heures d'incubation quand le milieu contient 5 p. 100 d'amidon. Comme la teneur en protéines décroît lorsque la teneur en amidon augmente, on peut retenir qu'un milieu à 3 p. 100 d'amidon permet d'obtenir la quantité de protéines la plus élevée par rapport à l'amidon consommé.

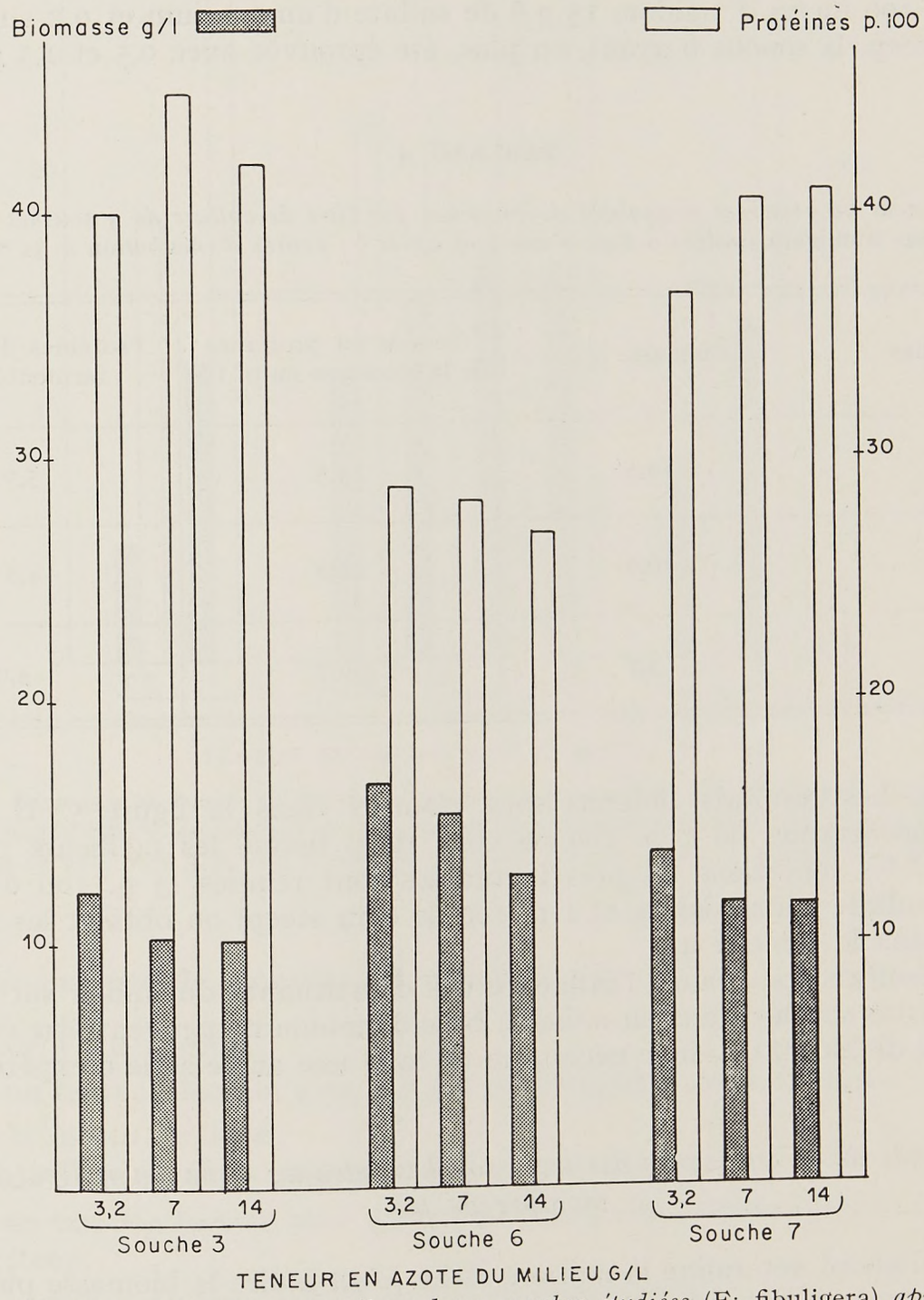


FIG. 4. — *Biomasse et teneur en protéines des 3 souches étudiées* (E. fibuligera) *après 64 heures d'incubation à 30 °C en fonction de la teneur en azote du milieu réparti en fioles de Fernbach. (milieu de base avec 3 p. 100 d'amidon, 1 p. 100 de corn steep, pH 4,5). L'azote est apporté sous forme d'urée ou de sulfate d'ammonium.*

Action de la nature et de la concentration de la source d'azote.

Les trois souches ont été cultivées en fioles de Fernbach dans un milieu contenant 3 p. 100 (m/v) d'amidon, 1 p. 100 (v/v) de corn steep et 3,2-7 et 14 g/l d'azote sous forme de sulfate d'ammonium ou d'urée. Les résultats sont résumés dans la figure 4.

On constate que l'azote peut être assimilé sous forme d'urée ou de sulfate d'ammonium, la concentration de 3,2 g/l étant suffisante pour assurer la biomasse la plus élevée, après 64 heures d'incubation à 30 °C.

Action de la concentration en corn steep

Les trois souches ont été cultivées en fioles de Fernbach dans un milieu contenant 3 p. 100 (m/v) d'amidon, 15 g/l de sulfate d'ammonium et 0,2 ou 1 p. 100 de corn steep, la souche 6 ayant, en plus, été éprouvée avec 0,5 et 1,5 p. 100 de corn steep. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 5. Il apparaît qu'une concentration de 1 p. 100 de corn steep donne les meilleurs résultats.

TABLEAU 4

Biomasse, teneur en protéines et quantité de protéines par litre de culture de 3 souches de l'espèce Endomycopsis fibuligera (*milieu à base d'amidon*) *après 64 heures d'incubation à 30 °C*

Souches	Biomasse g/l	Teneur en protéines de la biomasse en p. 100	Protéines du milieu fermenté g/l
3	14,5	34,5	5,0
6	16,6	28,8	4,8
7	13,7	36,7	5,0

Quand les conditions les plus favorables sont réunies (3 p. 100 d'amidon, 15 g/l de sulfate d'ammonium et 1 p. 100 de corn steep) on obtient les résultats résumés dans le tableau 4.

Ces résultats concernant l'influence des constituants du milieu sur la croissance des trois souches dans un milieu à base d'amidon ne peuvent être étendus à la mouture de blé. Il est donc nécessaire de faire une autre série d'expériences.

3.3. — *Étude de la croissance des trois souches retenues dans un milieu à base de mouture de blé*

On a d'abord déterminé la matière sèche (c'est-à-dire la biomasse plus le son et l'amidon non utilisé) et la teneur en protéines de cette matière sèche dans divers milieux liquides de complexité croissante contenant tous 5 p. 100 de mouture de blé (ce qui correspond environ à 3 p. 100 d'amidon).

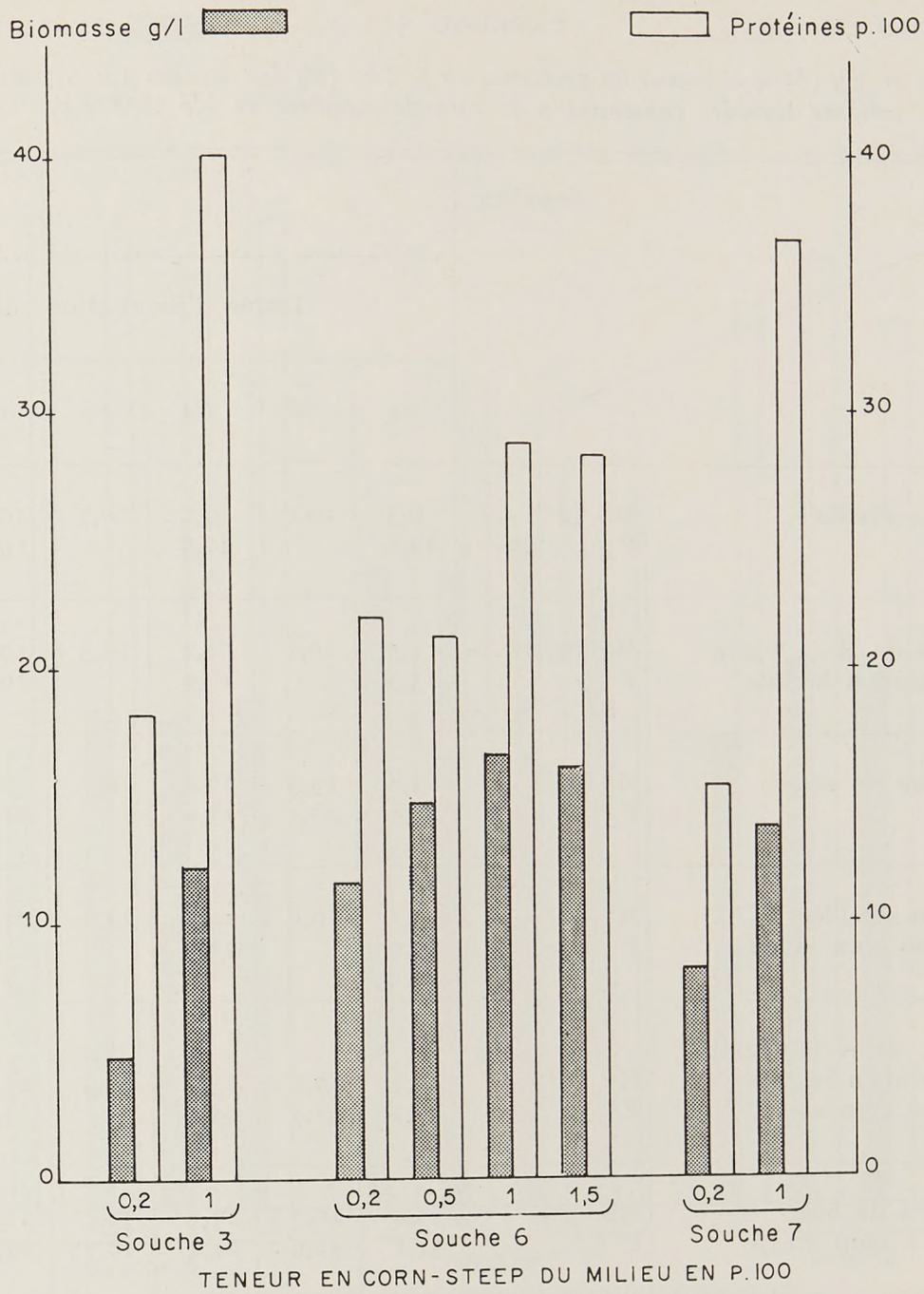


FIG. 5. — *Biomasse et teneur en protéines des 3 souches étudiées* (E. fibuligera) *après 64 heures d'incubation à 30 °C en fonction de la teneur en corn steep du milieu réparti en fioles de Fernbach. (milieu de base avec 3 p. 100 d'amidon, 15 g par litre de sulfate d'ammonium, pH 4,5).*

Cette quantité de mouture est répartie :

— dans de l'eau distillée,
— dans un tampon lactate avec 4,7 g/l de phosphate de potassium.
— dans le milieu de base,
— dans de l'eau distillée avec 1 p. 100 de corn steep,
— dans un tampon lactate avec 4,7 g/l de phosphate de potassium et 1 p. 100 de corn steep,
— dans le milieu de base avec 1 p. 100 de corn steep,
— dans le milieu de base avec 15 g/l de sulfate d'ammonium et 1 p. 100 de corn steep,

TABLEAU 5

Matières sèches en g/l (MS) et teneur en protéines en p. 100 (P) des souches 3,6 et 7 dans différents milieux liquides contenant 5 p. 100 de mouture de blé (pH 4,5)

Milieux \ Souches		3		6		7	
		Durée d'incubation (heures)					
		64	88	64	88	64	88
Eau distillée	MS (g/l) . .	9,3	10,0	9,2	10,7	10,7	11,1
	P %	23,1		20,5		19,8	
Phosphate de K (4,7 g/l) dans tampon lactate	MS (g/l) . .	11,5	10,2	14,2	14,5	10,9	8,6
	P %	23,5		22,6		26,6	
Milieu de base	MS (g/l) . .	13,8	19,3	26,2	26,4	26,0	25,7
	P % . . .	27,8	28,1	23,6		21,4	
Eau distillée 1 p. 100 corn steep	MS (g/l) . .	14,7	16,0	24,5	22,6	24,1	21,4
	P %	35,0		23,5		24,1	
Phosphate de K (4,7 g/l) dans tampon lactate 1 p. 100 corn steep	MS (g/l) . .	15,7	17,9	25,6	25,5	25,7	25,0
	P %	35,2	31,7	25,4		23,5	
Milieu de base 1 p. 100 corn steep	MS (g/l) . .	15,0	16,7	27,3	31,4	21,7	21,6
	P %	31,1	31,9	21,4	20,75	27,25	26,5
Milieu de base, $(NH_4)_2SO_4$ 15 g/l 1 p. 100 corn steep	MS (g/l) . .	20,1	19,2	25,8	29,3	26,6	26,9
	P %	37,6	33,8	30,2	28,2	31,2	30,0

Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

On note qu'il y a une croissance avec la mouture seule dans de l'eau distillée, ce qui démontre que les souches éprouvées utilisent l'azote organique, les sels minéraux et les facteurs de croissance contenus dans la mouture. Mais les teneurs de ces nutriments sont insuffisantes, et la croissance la plus élevée est obtenue dans le milieu de base additionné de corn steep et de sulfate d'ammonium.

D'autres essais, résumés dans la figure 6, ont démontré qu'une teneur de 0,5 p. 100 en corn steep donnait les rendements les plus élevés (matière sèche × teneur en protéines).

Quand les conditions les plus favorables sont réunies (5 p. 100 de mouture, 15 g/l de sulfate d'ammonium, 0,5 p. 100 de corn steep), on obtient les résultats résumés dans le tableau 6.

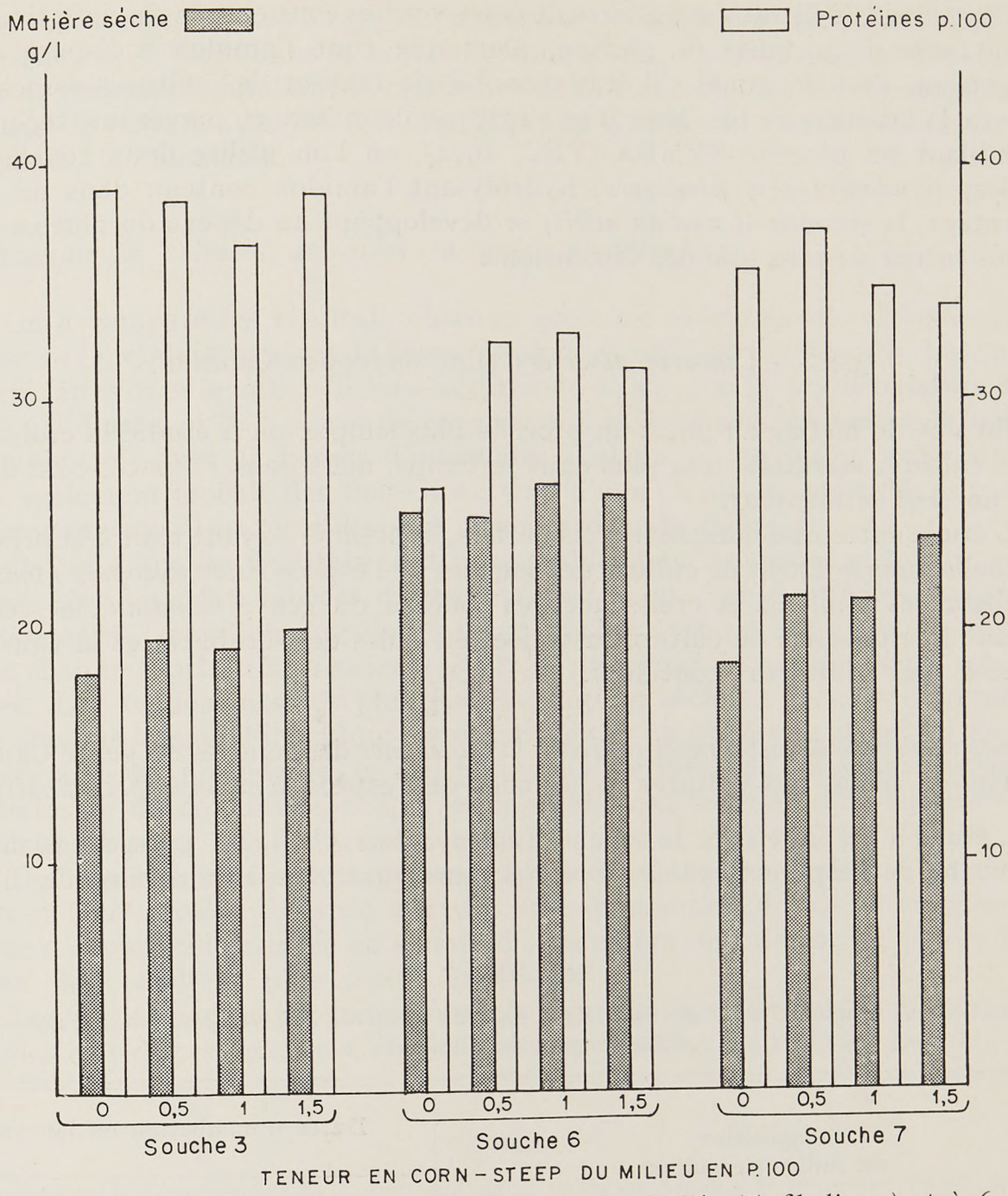


FIG. 6. — *Matière sèche et teneur en protéines des 3 souches étudiées* (E. fibuligera) *après 64 heures d'incubation à 30 °C en fonction de la teneur en corn steep du milieu réparti en fioles de Fernbach (milieu de base avec 5 p. 100 de mouture de blé et 15 g par litre de sulfate d'ammonium, pH 4,5).*

TABLEAU 6

Matière sèche, teneur en protéines, quantité et gain de protéines par litre de culture de 3 souches de l'espèce Endomycopsis fibuligera (*milieu à base de mouture de blé*)

Souches	Matière sèche g/l	Teneur en protéines de la matière sèche en p. 100	Protéines du milieu fermenté g/l	Gain en protéines g/l
3	19,6	43,0	8,4	1,9
6	25,8	30,2	7,8	1,3
7	26,6	31,2	8,3	1,8

Cependant, le filtrat des cultures de ces 3 souches contient, en fin de croissance, une quantité importante de glucose, alors que tout l'amidon a disparu. C'est pourquoi on s'est demandé s'il était possible de réaliser des cultures associées à partir de la mouture de blé. Mais il ne s'agit pas de mettre en œuvre une technique ressemblant au procédé SYMBA (PEC, 1974), où l'on utilise deux souches, la première (*Endomycopsis fibuligera*) hydrolysant l'amidon contenu dans un petit fermenteur, la seconde (*Candida utilis*) se développant au dépens du glucose dans un fermenteur de plus grandes dimensions.

3.4. — *Cultures associées* (Endomycopsis-Candida)

En vue de mettre au point un procédé plus simple, on a étudié la croissance de ces cultures associées, non plus dans le temps, mais dans l'espace, c'est-à-dire dans un seul fermenteur.

L'étude entreprise comporte trois parties, la première ayant trait à la présence éventuelle dans le filtrat de culture des souches de l'espèce *Endomycopsis fibuligera* de substances inhibant la croissance des souches du genre *Candida*, la seconde étudiant la croissance de cultures associées en fioles de Fernbach, et la troisième réalisant des cultures continues.

Présence éventuelle de substances inhibant la croissance des souches du genre *Candida* dans le filtrat des cultures de souches de l'espèce *Endomycopsis fibuligera*.

L'étude a été faite avec la souche *Endomycopsis fibuligera* 3. On a ensemencé une souche de l'espèce *Candida tropicalis* dans quatre milieux à base du filtrat

TABLEAU 7

Croissance de C. tropicalis *dans des milieux à base de filtrat de cultures provenant d'une souche d'*Endomycopsis fibuligera *3*

Composition du milieu de culture		Durée d'incubation en heures		
		40	64	88
Milieu témoin complet Milieu de base : Urée 15 g/l Corn steep 1 p. 100 Glucose 1 p. 100	MS (g/l) . .	3,7	3,4	3,4
	P %	28,3	27,0	29,5
Filtrat de culture seul	MS (g/l) . .	2,3	2,4	2,8
	P %	32,1	33,6	36,2
Filtrat de culture complété Milieu de base : Urée 15 g/l Corn steep 1 p. 100 Glucose 1 p. 100	MS (g/l) . .	5,9	7,1	7,1
	P %	36,1	30,8	27,2

MS : Matière sèche.
P : Teneur en protéines (N × 6,25) de la matière sèche.

d'une culture de la souche 3 (*E. fibuligera*) stérilisé par filtration (Millipore). Les résultats résumés dans le tableau 7 conduisent à penser qu'il ne paraît pas y avoir de substances inhibant la croissance de *C. tropicalis*. Le fait de supplémenter le filtrat de culture avec des sels minéraux, du glucose, de l'azote et du corn steep augmente la biomasse.

Réalisation de cultures associées en fioles de Fernbach

On a comparé les résultats obtenus avec une même souche d'*Endomycopsis fibuligera* (3) et deux espèces du genre *Candida*, *C. utilis* et *C. tropicalis*. Les cultures ont été faites dans le milieu de base additionné de 5 p. 100 (m/v) de mouture de blé, de 15 g/l d'urée, et de 1 p. 100 de corn steep. Les deux souches sont, soit inoculées ensemble, soit avec 24 heures d'intervalle (d'abord *E. fibuligera*, puis *Candida*). On a également inoculé des fioles avec 5 ml d'une culture mixte antérieure en fin de fermentation. Les résultats sont résumés dans la figure 7.

On note que les résultats sont comparables (matière sèche et teneur en protéines) avec les deux espèces du genre *Candida* que l'on a utilisées (*C. utilis* et *C. tropicalis*). Quand on inocule les deux souches avec un intervalle de 24 heures entre chaque souche (*E. fibuligera* étant la première), la matière sèche est moins élevée. Les rendements les plus élevés (matière sèche × teneur en protéines) sont obtenus lorsque l'inoculum est constitué par un prélèvement fait en fin d'une culture associée précédente, ce qui permet de vérifier que les deux souches sont présentes en fin de culture, et que les résultats sont fonction d'un équilibre entre les deux souches.

Des essais concernant la croissance des deux souches du genre *Candida* (*C. utilis* et *C. tropicalis*) dans un milieu à base de mouture de blé en fonction de la source d'azote utilisée (urée ou sulfate d'ammonium) ont démontré que ce dernier donne des résultats plus élevés (tabl. 8).

Les deux souches de genre *Candida* donnant des résultats comparables, on a associé une de ces souches (*C. tropicalis*) avec chacune des trois souches de l'espèce

TABLEAU 8

Croissance de deux souches de C. tropicalis *et* C. utilis *en fonction de la source d'azote utilisée*

Souche		*C. tropicalis*			*C. utilis*		
Durée d'incubation en heures		40	64	88	40	64	88
Urée	MS (g/l) . .	4,2	4,5	3,8	4,2	4,4	4,2
15 g/l	P %. . . .	38,6	38,8	39,7	39,2	39,2	39,3
$(NH_4)_2SO_4$	MS (g/l) . .	3,7	4,8	4,6	4,9	4,6	4,3
15 g/l	P %. . . .	48,0	49,0		45,7	46,7	

MS : Matière sèche.
P : Teneur en protéines (N × 6,25).

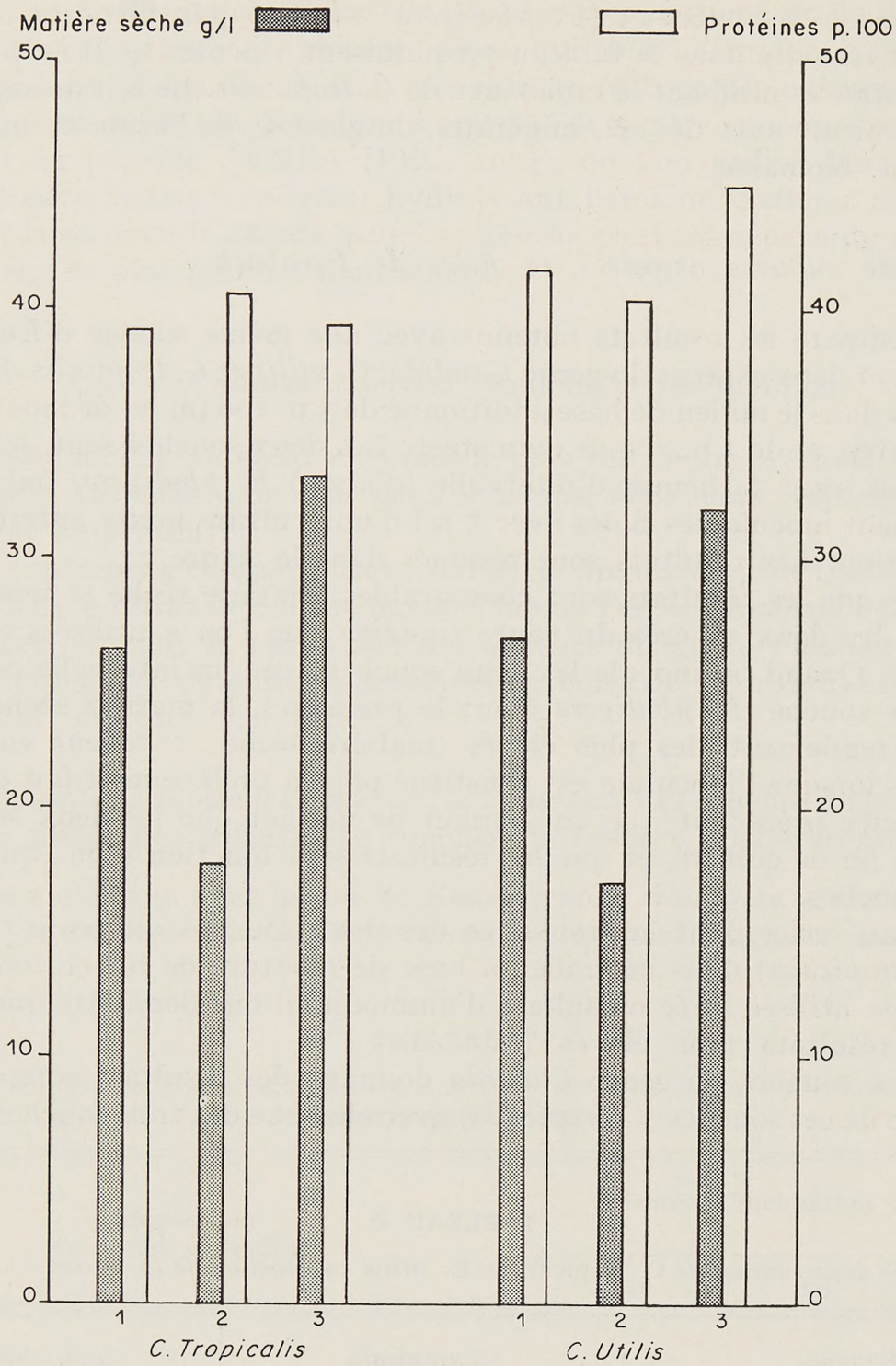


FIG. 7. — *Matière sèche et teneur en protéines des cultures associées* (Endomycopsis fibuligera 3 *et* Candida tropicalis *ou* C. utilis) *dans un milieu de base contenant 5 p. 100 de mouture de blé, 15 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 de corn steep, à pH 4,5, réparti en fioles de Fernbach, suivant trois modes d'inoculation, après 64 heures d'incubation à 30 °C.*

1 : inoculations simultanées.
2 : inoculations séparées par 24 heures d'intervalle.
3 : inoculation réalisée avec une culture mixte antérieure.

Endomycopsis fibuligera retenues auparavant (3,6 et 7) en utilisant un milieu à base de mouture de blé (5 p. 100), de sulfate d'ammonium (15 g/l) et de corn steep (1 p. 100) réparti en fioles de Fernbach. Les résultats sont résumés dans la figure 8.

Il apparaît que l'association *E. fibuligera* 6- *C. tropicalis* donne un gain en

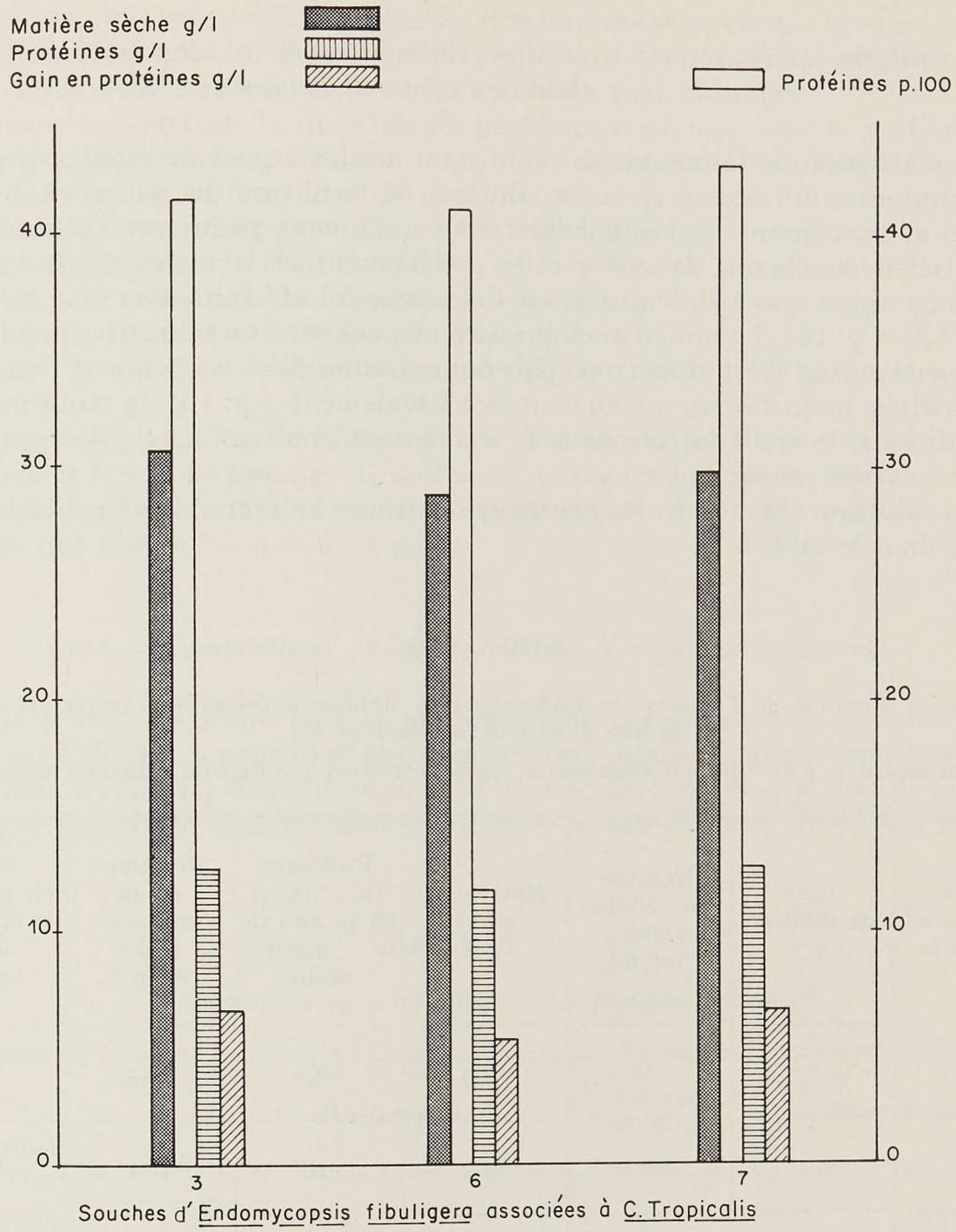


FIG. 8. — *Croissance des cultures associées* (Candida tropicalis *et* Endomycopsis fibuligera *3,6 ou 7 dans un milieu de base contenant 5 p. 100 de mouture de blé, 15 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 p. 100 de corn steep, à pH 4,5, réparti en fioles de Fernbach, après 64 heures d'incubation, à 30 °C. On a mesuré dans chaque cas la matière sèche et la teneur en protéines et calculé la quantité de protéines présentes dans la matière sèche. On a aussi calculé le gain en protéines dans la matière sèche du milieu en fin de fermentation.*

protéines un peu plus faible (5,3 g/l) que les deux autres (6,2 g/l). Cependant on retient cette association pour réaliser des cultures continues, car c'est la seule qui donne des cultures liquides, les cultures visqueuses posant des problèmes techniques difficiles à résoudre dans un petit fermenteur. En fin de cultures associées, on dénombre environ 10^8 cellules par ml (*E. fibuligera*) et 2×10^9 cellules/ml (*C. tropicalis*).

3.5. — *Cultures continues de l'association* Endomycopsis fibuligera 6 — *Candida tropicalis dans un milieu à base de mouture de blé.*

La réalisation de fermentations continues mixtes a posé de nombreux problèmes techniques, difficiles à résoudre, du fait de la nature du milieu et du faible volume du fermenteur. Les difficultés ont notamment porté sur l'alimentation, la régulation du niveau, le système de prélèvement et le maintien de l'asepsie.

Les premiers essais de cultures en fioles avaient été faits avec une teneur en mouture de 5 p. 100. Le milieu ainsi préparé ne peut servir à alimenter une fermentation continue car il est alors trop épais pour circuler dans les pompes. Pour éviter ces difficultés, on utilise un milieu contenant seulement 3 p. 100 de mouture. Dans ces conditions, le moût injecté dans le fermenteur contient 2,34 g/l de protéines dans la matière sèche.

Les résultats obtenus en fermentation continue à divers taux de dilution sont résumés dans le tableau 9.

TABLEAU 9

Fermentation continue de l'association Endomycopsis fibuligera 6-Candida tropicalis *dans un milieu à base de mouture de blé*

(30 g de mouture, 15 g de sulfate d'ammonium, 5 g de corn steep par litre de milieu de base) à 30 °C.

Durée d'incubation en heures	Taux de dilution h^{-1}	Nombre de cellules viables 10^6/ml	Matière sèche g/l	Protéines (N × 6,25) en p. 100 de la matière sèche	Protéines de la matière sèche en g/l	Gains en protéines de la matière sèche en g/l
0	—	10	11,5	20,5	2,34	—
72	0	400	14,7	27,6	4,04	1,70
112	0,09	110	12,4	27,1	3,36	1,02
185	0,05	310	13,0	30,4	3,95	1,61

Témoin : *Candida tropicalis* en culture pure

0	—	15	17,8	12,7	2,26	—
64	0	140	18,5	13,7	2,53	0,27
110	0,05	170	16,5	17,4	2,86	0,60

On note qu'il est possible de réaliser une fermentation continue en maintenant l'association des deux souches (*E. fibuligera 6* — *C. tropicalis*) pendant une assez longue durée (185 heures), sans contamination.

Lorsqu'on soustrait la quantité de protéines contenue dans la matière sèche d'un litre de milieu non ensemencé (2,34 g/l) à la quantité de protéines contenue dans la matière sèche d'un litre de moût fermenté (3,95 g/l), il reste un gain de 1,60 g/l, de l'ordre de 68 p. 100. Pour maintenir l'association et obtenir ce résultat, il faut un faible taux de dilution ($D = 0,05\ h^{-1}$). Ce fait s'explique si l'on retient que le taux de croissance de la souche amylolytique (*E. fibuligera*) est plus faible que celui de la souche associée (*C. tropicalis*).

Quand le taux de dilution augmente ($D = 0,09\ h^{-1}$), le gain en protéines diminue (1,02 g/l).

Cependant, le milieu de culture à base de mouture de blé permet une certaine croissance de la souche associée (*C. tropicalis*) qui se traduit par un gain en protéines notable (0,60 g/l). Il faut en tenir compte pour calculer l'efficacité réelle des cultures associées qui n'est plus que de 1 g/l.

3.6. — *Composition en acides aminés des protéines obtenues*

Elle a été déterminée sur la matière sèche après une culture pure d'*Endomycopsis fibuligera* (souche 6) et après une culture mixte (*Endomycopsis fibuligera 6* — *Candida tropicalis*) dans un milieu de base additionné de 5 p. 100 de mouture, de 15 g/l de sulfate d'ammonium et de 0, 5 p. 100 de corn steep. Les résultats

TABLEAU 10

Composition en acides aminés des protéines obtenues

Souche / Acides aminés	*E. fibuligera*	*E. fibuligera* + *C. tropicalis*	Mouture ITCF
A. aspartique	9,2	10,9	8,5
Thréonine	5,4	6,7	3,4
Sérine	5,9	6,7	5,8
A. glutamique	18,3	14,9	23,3
Proline	6,5	4,9	10,5
Glycine	4,7	5,2	4,7
Alanine	5,9	6,5	4,7
Valine	5,2	5,0	4,1
Méthionine	1,5	1,2	1,6
Isoleucine	4,5	4,2	3,5
Leucine	7,9	7,3	7,4
Tyrosine	4,2	4,3	3,3
Phénylalanine	5,0	5,7	5,0
Lysine	7,4	7,7	4,0
Histidine	2,6	2,8	3,3
Arginine	5,8	5,8	6,2
	100	100	100

obtenus ainsi que la composition de la mouture ITCF sont résumés dans le tableau 10.

On note qu'il y a une augmentation de la teneur en lysine dans les deux cas.

IV. — Discussion et conclusion

A la lecture des résultats, on en déduit qu'il est possible de produire des protéines microbiennes à partir de mouture de blé additionnée de sels minéraux et de facteurs de croissance.

La source d'azote peut être fournie par de l'urée ou du sulfate d'ammonium.

On a utilisé diverses souches de levures en cultures discontinues, seules (*Endomycopsis fibuligera*) ou en association (*Endomycopsis fibuligera* + *Candida tropicalis*). Les gains en protéines de la matière sèche finale sont faibles dans le cas d'une souche amylolytique seule, soit 1,9 g/l avec *E. fibuligera 3* (tabl. 6). Ils atteignent 6,2 g/l (fig. 8) dans le cas de cultures associées (*E. fibuligera 3* + *C. tropicalis*).

Ces faits s'expliquent par le fort pouvoir amylolytique des souches de l'espèce *Endomycopsis fibuligera* associé au taux de croissance et à la teneur en protéines plus élevés de l'espèce *Candida tropicalis* (tabl. 8).

Il faut noter que l'on a également observé un gain en protéines dans le cas d'une souche de *Candida tropicalis* cultivée seule en continu (tabl. 9), ce qui indique l'existence d'une activité amylolytique notable.

Dans des essais préliminaires, les conditions les plus favorables paraissent réunies quand il y a 5 p. 100 de mouture, 0,5 p. 100 de corn steep et 15 g/l de sulfate d'ammonium. Il est évident que la détermination des conditions optimales de cette fermentation nécessiterait la mise en œuvre de méthodes plus élaborées. Le rendement en protéines exprimé en $g/l^{-1}h^{-1}$, obtenues lors d'une fermentation continue des deux souches associées est trop faible (tabl. 9) pour faire l'objet d'applications industrielles (HESLOT *et coll.* 1975).

L'amélioration des résultats doit donc être recherchée dans deux directions

— sélection de souches de l'espèce *Candida tropicalis*, douées d'une plus forte activité amylolytique.

— obtention d'hybrides intergénétiques entre des souches des deux espèces utilisées dans l'association (*E. fibuligera C. tropicalis*).

Ces recherches sont actuellement en cours.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciements

Ce travail a fait l'objet d'une Convention de Recherches passée entre l'Office National Interprofessionnel des Céréales (O.N.I.C.) et l'Association pour le Développement de l'Enseignement du Perfectionnement et de la Recherche à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon (A.D.E.P.R.I.N.A.).

Nous remercions M. André GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et de Physicochimie des Céréales (I.N.R.A.) et ses collaborateurs pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée.

Summary

Protein production by micro-organisms from ground wheat

The action of several factors (starch, content, nature and concentration of the nitrogen source, corn steep concentration) on biomass and protein content of three amylolytic yeast strains (*Endomycopsis fibuligera*) was studied.

By fermentation of a medium containing ground wheat inoculated with these strains either alone or associated with *Candida utilis* and *Candida tropicalis*, microbial proteins were obtained.

A continuous fermentation step with two associated strain (*E. fibuligera-C. tropicalis*) was thus carried out. For a medium containing 3 p. 100 ground wheat, 0,5 p. 100 corn-steep, 15 g/l ammonium sulphate, plus mineral salts, and on condition that the dilution rate is low ($D = 0{,}05\ h^{-1}$), the protein increasing is 1,6 g/l on a dry matter basis.

The protein so obtained has a high lysine content (7,7 p. 100).

Références bibliographiques

A.G.P.B., 1973. *L'approvisionnement en protéines : orientations possibles*, 49e Congrès, Strasbourg.

Bacova M., Klaushofer H., Zelinka J., 1968. Aminoacid, vitamin and growth factor content in protein concentrate « fibulin ». *Biologia* (Bratislava), **23**, 175-177.

Drapron R., Guilbot A., 1962. Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 175-218.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers R. A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350.

Heslot H., Riviere J., Coudert M., Germain R., 1975. *Procédé pour la préparation d'un produit riche en lysine*. Brevet n° 7 523 275 du 25 juillet 1975.

Jarl K., 1969. Symba Yeast Process. *Food Technology*, **23**, 1009.

Jarl K., Tveit M., 1963. Socker, Handlingar II (Communication from the Swedish Sugar Corporation). **18**, 25.

Kihlberg R., 1972. The microbe as a source of foods. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 427-466.

Lachance M. A., Blackwood A. C., 1972. Étude de la croissance d'*Endomycopsis fibuligera* sur des résidus de pâtes alimentaires. Ann. Cong. ACFAS, Ottawa.

Mac Lennan D. G., 1974. Australian Research into single cell protein plant. *Agriscene Australia*, 56-58.

Norris J. R., Ribbons D. W., 1971. *Methods in Microbiology*. Academic Press. Vol. 5B, 218.

Pec, 1974. The Symba Process. Process Engineering Company. CH-8708 Mannedorf, Suisse.

Polivka L., Zelinka J., 1969. The yeast biomass production of *Endomycopsis fibuligera* on starch media. *Biologia* (Bratislava), **24**, 873-880.

Polivka L., Zelinka J., 1969. The yeast biomas production by *Endomycopsis fibuligera* on media with wastes of starch production. *Biologia* (Bratislava), **24**, 881-884.

Tveit M. T., 1963. *Svenska Sockerfabriks Aktiobolaget*. Brevet U.S. 3.105.799.

Wickerham L. J., Kuehner C. C., 1956. Brevet U.S. 2.764.487.

Wiken T. O., 1972. Utilization of agricultural and industrial wastes by cultivation of yeasts Proc. V IFS. *Ferment. Technol. Today*, 569.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 609-627.

Étude de la qualité des viandes de bovin

II. — Comparaison des caractéristiques organoleptiques des viandes de Taurillon et d'animal adulte

R. GOUTEFONGEA et C. VALIN

avec la collaboration technique de W. CHATELIER, C. DENOYER et R. MANGUIN

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.,
Theix, 63110 Beaumont

Résumé

Une étude comparée des qualités organoleptiques des viandes de vache et de taurillon a été réalisée.

Au niveau de la composition des muscles après maturation on observe des différences entre les deux types de viande. Les viandes de vache ont tendance à présenter une teneur en pigment plus élevée, une teneur en glycogène résiduel plus élevée pour un même pH ultime, un pourcentage de déphosphorylation des nucléotides inférieur et une teneur en lipides neutres intramusculaires supérieure.

Les principales différences de qualités organoleptiques entre les deux types de viande se situent au niveau de la flaveur et de la jutosité. Les viandes de taurillon présentent une saveur et une jutosité inférieures à celles des viandes de vache de réforme.

Globalement il existe une relation significative et étroite entre la teneur en lipides et l'intensité de la flaveur. L'analyse de la relation pigments/flaveur et pigments/lipides permet d'avancer l'hypothèse d'une influence du type métabolique des fibres musculaires sur l'intensité de la flaveur de la viande.

Mots-clés : *Qualité — Viande — Bovin adulte — Taurillon — Organoleptiques.*

Le consommateur recherche dans la viande la satisfaction d'apprécier des caractéristiques sensorielles spécifiques de cet aliment. Ce facteur est primordial et, plus que des considérations, plus ou moins fondées d'ailleurs, sur la valeur alimentaire, il conditionne en grande partie, d'une part la consommation totale de viande et d'autre part la consommation respective des viandes des différentes espèces.

La consommation de viande bovine a ainsi régulièrement augmenté au cours de la dernière décennie et, bien qu'elle soit en stagnation en France depuis quelques années, un déficit de production existe à l'échelon européen.

L'intensification de la production de viande bovine a conduit, en France et dans de nombreux pays, au développement de l'élevage de jeunes taureaux, abattus à un âge compris entre 12 et 20 mois.

Bien que ce type de production présente certains avantages zootechniques et que les animaux qui en sont issus montrent un certain intérêt tant à l'abattage par un rendement élevé, qu'à la découpe, par une composition corporelle mieux maîtrisée, le consommateur ne retrouve pas chez le taurillon les qualités qu'il apprécie dans la viande d'animal adulte. On reproche en particulier à ce type de viande une coloration insuffisante, une tendreté variable, un pouvoir de rétention d'eau médiocre, et un manque de sapidité. Un certain nombre de travaux (FIELD, 1971, REAGAN *et al.*, 1971, ALBAUGH *et al.*, 1975) ont déjà mis en évidence certaines des différences qui peuvent exister entre les qualités organoleptiques des viandes de taurillon et celles d'animaux castrés de même âge ou plus âgés.

Après avoir présenté les modalités du déroulement des phénomènes biochimiques *post mortem* dans les viandes de taurillon (VALIN *et al.* 1975), cette étude a pour but de comparer sur le plan des qualités organoleptiques ces viandes à celles d'animaux nettement plus âgés, en l'occurence des vaches de réforme qui fournissent la majeure partie des viandes bovines consommées en France, et de tenter de relier les différences observées à certaines caractéristiques musculaires.

Matériel et méthodes

1. — *Matériel animal*

L'étude a porté sur 12 couples taurillon-vache. Les taurillons provenaient de la Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants et appartenaient à différentes races et croisements. Tous ont été abattus entre 15 et 17 mois et leurs poids de carcasse variaient de 215 à 315 kg.

Les vaches provenaient du commerce local. Elles étaient choisies sur des critères de bonne conformation et d'état d'engraissement correspondant à la première qualité. Elles appartenaient également à plusieurs races ou croisements, leur âge à l'abattage s'échelonnait de 4 à 10 ans (moyenne 7 ans), et leur poids de carcasse moyen était de 312 kg (282 à 325 kg).

Les animaux étaient abattus dans les installations du C.R.Z.V. de Theix et 2 heures après l'abattage les carcasses étaient placées en chambre froide à + 4 °C pour ressuage pendant 24 heures.

2. — *Techniques*

Sur la moitié gauche de chaque animal, on prélevait, 24 h après l'abattage, la fraction comprise entre la cinquième et la dixième côte. Ce morceau subissait une maturation de 9 jours, enveloppé dans une feuille d'aluminium, dans une chambre froide à + 4 °C. Après cette période de maturation, le muscle *Longissimus dorsi* était disséqué et séparé transversalement en 2 parties, l'une servant aux

déterminations physicochimiques et biochimiques, l'autre à la dégustation, qui avait lieu le dixième jour après l'abattage.

2.1. — *Déterminations physiques et physicochimiques (9 jours p.m.)*

— pH : déterminé au moyen d'un pH mètre portatif EIL 30 C muni d'une électrode combinée.

— Teneur en matière sèche : mesurée après traitement à l'étuve à 102 °C pendant 48 h.

— Pouvoir de rétention d'eau : déterminé selon la méthode de pression (GOUTEFONGEA, 1966).

— Évaluation mécanique de la tendreté : pour cette mesure, nous avons utilisé l'appareil mis au point par SALE (1971) qui permet de mesurer simultanément la valeur F de la force maximum de cisaillement, l'épaisseur *e* de l'échantillon et le travail W dépensé au cours du cisaillement, puis de calculer F et W pour l'épaisseur unité.

— Teneur en pigments : déterminée selon la méthode d'HORNSEY (1956).

— Spectres de reflectance; ils ont été réalisés entre 420 et 640 nm en réflexion à 45° à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS 1800 double faisceau équipé d'un enregistreur GRAPHISPOT SEFRAM, les échantillons de viande étant découpés de façon à ce que la surface de réflexion soit perpendiculaire à la direction des fibres musculaires. La référence était constituée par un gris étalon. Pour des raisons techniques, les spectres n'ont pu être établis que pour 7 couples d'échantillons.

2.2. — *Déterminations biochimiques*

Sur un extrait à l'acide perchlorique (PCA) (10 g de muscle pour 100 ml d'acide perchlorique 0,6 N) neutralisé après centrifugation (15 min à 5 000 g) par KOH puis filtré pour éliminer le précipité de perchlorate de potassium, on réalisait les déterminations suivantes :

— le glucose par la méthode enzymatique à la glucose oxydase selon HUGUETT et NIXON (1957);

— le glycogène était hydrolysé en glucose en milieu acide (H_2SO_4 N) à 100° pendant 3 h puis le glucose dosé selon la méthode précitée;

— l'acide lactique et le glucose 6-phosphate par la méthode enzymatique de BERGMEYER (1963);

— l'ammoniac par déplacement dans l'extrait au moyen de carbonate de lithium puis distillation et dosage par HCL 0,1N;

— les nucléotides : leur état de dégradation était mesuré par la détermination d'un indice de déphosphorylation ainsi calculé : mesure de la densité optique à 253 nm de l'extrait PCA; passage de l'extrait sur une colonne de DOWEX 1 × 8 équilibré sous la forme $HCOO^-$, seules les formes déphosphorylées ne sont pas retenues. La mesure de la densité optique de l'éluat à 253 nm permet de calculer le rapport D.O. éluat/D.O. extrait total qui fournit le pourcentage de formes déphosphorylées par rapport aux nucléotides totaux (VALIN, CHARPENTIER, 1969);

— les lipides totaux étaient extraits par la méthode de FOLCH *et al.* (1957) au mélange chloroforme méthanol, puis les phospholipides séparés des lipides neutres par passage des lipides totaux en solution dans le chloroforme sur une colonne d'acide silicique et élutions successives au chloroforme puis au méthanol;

— la composition en acides gras des deux fractions était déterminée par chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques au moyen d'un chromatographe GIRDEL 75 CD/PT équipé de colonnes en inox de 1/8″ (3,2 mm) de diamètre, 3 m de long, remplies de butane-diol-succinate 20 p. 100 sur Chromosorb W.A.W. 80-100 mesh. La chromatographie était réalisée à 195 °C (isotherme);

— les acides aminés libres du muscle étaient extraits et dosés selon la technique mise au point par PAWLAK et PION (1968) d'après les méthodes de MOORE *et al.* (1958) et SPACKMAN *et al.* (1958).

2.3. — *Jugement des qualités organoleptiques*

Un jury de 8 personnes sélectionnées après vérification de leur aptitude à la détection des 4 saveurs fondamentales et entraînées à déguster de la viande, était utilisé pour ce jugement.

Les échantillons soumis à la dégustation étaient constitués de tranches de 15 mm d'épaisseur, cuits pendant 1 min sur chaque face au moyen d'une plaque chauffante, légèrement huilée, à la température de 250 °C.

La technique utilisée était celle du test triangulaire, accompagnée d'une notation de 0 à 10 pour chacun des trois critères fondamentaux : tendreté, succulence et flaveur et d'une appréciation de préférence globale. L'utilisation du test triangulaire permettait d'éliminer les notes des dégustateurs n'ayant pas reconnu l'échantillon unique. Les séances de dégustation avaient lieu à 10 h du matin; chaque dégustateur recevait successivement deux assiettes contenant trois échantillons chacune, l'échantillon doublé étant au hasard, soit de la viande de vache, soit de la viande de taurillon, de manière à ce que globalement les échantillons de chaque type soient en nombre égal. Les dégustateurs avaient la possibilité, au cours de la séance, de boire de l'eau et de manger du pain.

2.4. — *Techniques statistiques*

L'exploitation statistique des résultats a été effectuée en utilisant, pour les données physicochimiques et biochimiques, le test *t* de Student par couples et dans certains cas, le test *u* par rang de MANN et WHITNEY. Le test *t* a également été appliqué aux notes de tendreté, jutosité et flaveur. En outre, pour ces caractéristiques et l'appréciation de préférence globale, nous avons considéré également le nombre total de dégustateurs ayant marqué une préférence pour l'un ou l'autre des types de viande.

Les résultats du test triangulaire ont été exploités selon la table de ROESSLER *et al.* (1948).

Résultats

1. — *Caractéristiques physicochimiques et biochimiques*

1.1. — *pH, teneur en matières sèches et pouvoir de rétention d'eau*

Comme le montrent les valeurs rassemblées dans le tableau 1, aucune différence significative n'apparaît pour ces trois caractéristiques entre les 2 types de viande. Tout au plus peut-on noter une variabilité apparemment plus importante

TABLEAU I

Comparaison des caractéristiques physicochimiques

N° couple		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\overline{X} \pm s$	
pH	T	5,44	6,02	5,41	5,49	5,47	5,45	5,75	5,65	5,67	5,40	5,60	5,57	5,58 ± 0,18	NS
	V	5,47	5,56	5,39	5,47	5,51	5,70	5,48	5,54	5,50	5,60	5,50	5,62	5,53 ± 0,08	
Matière sèche % du muscle frais	T	25,4	24,8	24,9	22,6	24,3	24,0	22,4	24,4	23,6	23,7	24,6	25,5	24,2 ± 1,0	NS
	V	26,0	26,7	27,5	24,4	27,1	24,7	26,5	24,0	26,0	22,5	18,6	23,8	24,8 ± 2,5	
Pouvoir de rétention d'eau % eau libre	T	23,4	13,9	22,0	24,6	23,7	24,9	27,7	19,6	27,5	28,0	33,0	16,0	23,7 ± 5,3	NS
	V	18,1	17,1	17,5	23,3	21,8	28,2	20,8	21,0	26,5	24,0	28,0	30,0	23,0 ± 4,4	
mg d'eau non libre par g de matière sèche	T	2,0	2,4	2,1	2,3	2,1	2,1	2,2	2,3	2,1	2,0	1,7	2,3	2,2 ± 0,2	NS
	V	2,2	2,1	2,0	2,1	1,8	1,9	2,0	2,3	1,8	2,4	2,9	1,9	2,1 ± 0,3	

mais non significative du pH dans la viande de taurillon, bien que dans cette expérience nous n'ayions pas rencontré de viande à pH anormalement élevé comme cela est parfois le cas avec les jeunes taureaux.

1.2. — *Évaluation mécanique de la tendreté*

En raison de l'hétérogénéité de la viande, 10 déterminations ont été effectuées sur chaque échantillon. Le tableau 2 rassemble les résultats obtenus pour le travail W et la force F de cisaillement (e = épaisseur de l'échantillon) et le rapport entre ces deux grandeurs. Les différences observées entre les types de viande pour ces trois caractéristiques sont en moyenne faibles et non significatives. Les valeurs des rapports W/Fe montrent que les viandes comparées avaient sensiblement le même degré de maturation (VALIN *et al.*, 1975).

1.3. — *Couleur*

Le tableau 3 rapporte les valeurs des teneurs en pigments totaux ainsi que les caractéristiques permettant de définir une couleur à savoir la luminosité Y, la teinte (définie par la longueur d'onde dominante λd) et la saturation définie par la pureté d'excitation Pe. On observe, fait déjà bien connu, que la teneur en pigments est nettement inférieure dans la viande de taurillon (4,4 mg/g contre 7,3 mg/g en moyenne). Cette différence est significative au seuil de 1 p. 100.

Les différences observées au niveau des caractéristiques de la couleur sont beaucoup moins nettes. Bien que les résultats soient en accord avec ceux obtenus par RENERRE et VALIN (1976) étudiant l'évolution des mêmes caractéristiques de la couleur en fonction de l'âge chez des animaux de race Limousine et montrant une diminution de Y et une augmentation de λd et de Pe avec l'âge, la comparaison des moyennes par le test t montre que les différences ne sont pas significatives. Il faut cependant noter que le calcul des caractéristiques de couleur a été réalisé par la méthode des 10 ordonnées sélectionnées, méthode moins discriminante que celle qui consiste à faire les mêmes calculs à partir des pourcentages de réflectance enregistrés à des intervalles de 5 nm entre 400 et 700 nm (RENERRE et VALIN, 1976). L'application du test u (classement par rang) permet de mettre en évidence une différence significative au seuil de 10 p. 100 en ce qui concerne Y, montrant par-là que la viande de taurillon est plus claire. Cette différence est significative au seuil 2,5 p. 100 si on fait abstraction du taurillon du couple 2 dont la viande est particulièrement sombre du fait de la valeur élevée de son pH.

1.4. — *Les produits de dégradation*

Déphosphorylation des nucléotides :

Le pourcentage de déphosphorylation des nucléotides renseigne sur le catabolisme *post mortem* des nucléotides du muscle. En fait, compte tenu du temps écoulé depuis l'abattage, les formes non déphosphorylées sont essentiellement constituées par l'IMP et l'ADP liés aux protéines myofibrillaires.

Les résultats du tableau 4 montrent que le pourcentage de déphosphorylation est inférieur dans la viande d'adulte, ce qui correspond à une teneur en IMP supé-

TABLEAU 2

Comparaison des caractéristiques de cisaillement des muscles de vache et de taurillon

N° couple		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\overline{X} \pm s$	
W djoules	T	0,57	0,33	0,38	0,36	0,28	0,32	0,35	0,51	0,27	0,53	0,36	0,42	0,39 ± 0,13	NS
	V	0,43	0,42	0,25	0,56	0,40	0,25	0,45	0,36	0,38	0,42	0,38	0,47	0,40 ± 0,13	
F daN	T	1,87	1,10	1,98	1,96	1,73	1,23	1,75	1,32	1,08	1,41	1,07	1,53	1,50 ± 0,35	NS
	V	1,33	1,63	1,22	1,99	1,66	1,06	2,02	1,48	1,17	1,16	1,26	1,29	1,44 ± 0,32	
W/F*e*	T	0,30	0,33	0,19	0,18	0,16	0,26	0,20	0,39	0,25	0,37	0,33	0,27	0,27 ± 0,08	NS
	V	0,32	0,26	0,20	0,28	0,24	0,24	0,22	0,24	0,32	0,36	0,30	0,36	0,28 ± 0,05	

TABLEAU 3

Comparaison des teneurs en pigment et des caractéristiques de la couleur

N° couple		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\overline{X} \pm s$	
Teneur en pigments mg/g. . .	T . .	3,92	4,42	4,55	5,82	4,93	5,44	3,29	3,79	3,54	3,42	5,21	4,40	4,39 ± 0,83	S
	V . .	9,23	12,01	9,36	7,27	6,77	3,41	6,83	8,04	4,55	6,98	7,40	5,50	7,28 ± 2,28	
Luminosité Y	T . .	—	3,4	5,6	—	4,7	5,4	5,9	5,3	4,5	—	—	—	5,0 ± 0,9	NS
	V . .	—	4,7	2,5	—	4,2	6,8	3,9	3,6	4,6	—	—	—	4,3 ± 1,3	
Longueur d'onde dominante d nm	T . .	—	605	596	—	592	589	582	590	587	—	—	—	591 ± 7,3	NS
	V . .	—	599	606	—	595	581	586	599	592	—	—	—	594 ± 8,5	
Pureté d'excitation P*e*	T . .	—	0,100	0,185	—	0,224	0,163	0,153	0,120	0,180	—	—	—	0,16 ± 0,04	NS
	V . .	—	0,163	0,342	—	0,179	0,040	0,316	0,163	0,246	—	—	—	0,21 ± 0,10	

TABLEAU 4

Composition chimique

N° couple		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\overline{X} \pm s$	
% nucléotides déphosphorylés	T	34	52	41	36	52	47	57	33	35	37	39	32	41,1 ± 8,5	NS
	V	30	33	33	44	35	31	36	42	32	46	30	27	34,7 ± 6,4	
Somme glycogène résiduel + produits de dégradation µmoles glucose/g muscle	T	69	38	53	72	54	57	33	53	56	47	57	70	54,7 ± 11,9	NS
	V	55	60	72	72	49	58	71	57	67	69	53	48	60,9 ± 9,1	
Glycogène résiduel µmoles glucose/g muscle	T	9,5	1,2	2,0	19,7	7,6	4,3	0,5	0,5	0	0,6	0,5	0,8	3,9 ± 5,8	NS
	V	3,0	16,4	16,8	15,9	1,0	2,3	16,1	2,2	8,3	25,2	0,8	2,5	9,2 ± 8,4	
Lipides totaux % muscle	T	1,3	1,2	3,1	1,7	2,2	2,0	1,1	1,2	2,6	1,2	1,5	1,1	1,7 ± 0,7	NS
	V	1,7	5,0	3,3	2,8	1,9	1,8	4,0	1,4	2,1	1,4	1,4	2,3	2,4 ± 1,1	
Phospholipides % muscle frais	T	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,62 ± 0,04	NS
	V	0,6	0,7	0,7	0,8	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,8	0,6	0,5	0,61 ± 0,1	
Lipides neutres % muscle frais	T	0,7	0,5	2,5	1,1	1,4	1,3	0,5	0,6	1,9	0,6	0,9	0,5	1,04 ± 0,6	NS
	V	1,1	4,3	2,6	2,0	1,3	1,2	3,4	0,8	1,6	0,6	0,5	1,8	1,77 ± 1,1	

rieure dans ce type de viande, car la teneur en ADP est une constante, mais cette différence n'est pas significative au seuil de 5 p. 100 bien qu'elle s'en approche ($t = 2{,}028$).

Produits de la glycolyse

Ces produits sont constitués essentiellement par le glycogène résiduel, le glucose, le glucose 6-phosphate (G6P) et l'acide lactique. Les autres intermédiaires de la glycolyse n'existant qu'à l'état de traces sont négligeables.

Pour chacun de ces composés, ainsi que pour la somme glycogène résiduel + glucose + glucose 6 phosphate + 1/2 Ac. lactique, qui représente sensiblement le glycogène initial, aucune différence significative n'apparaît entre les 2 types de viande. On peut simplement noter la tendance à une teneur en glycogène résiduel plus élevée chez l'adulte ainsi qu'une variabilité plus grande des teneurs en glucose, G6P et acide lactique chez le taurillon. L'analyse par rang (test *u*) révèle une différence significative au seuil de 2,5 p. 100 des teneurs en glycogène résiduel.

Ammoniac et acides aminés libres

Tant pour l'ammoniac que pour les acides aminés libres, que ceux-ci soient considérés individuellement, regroupés en acides aminés acides et basiques ou globalement, aucune différence significative ne peut être mise en évidence à l'exception de : glycine, proline et acide aspartique, pour lesquels on observe une différence significative au seuil de 5 p. 100, la teneur de la viande de taurillon en ces composés étant supérieure.

1.5. — *Lipides*

La viande d'animal adulte est plus riche en lipides totaux intramusculaires d'environ 50 p. 100 en moyenne (différence non significative au seuil de 5 p. 100 $t = 1{,}926$). Toutefois, après avoir effectué la séparation des phospholipides, on constate que cette fraction est sensiblement constante dans les 2 types de viande et est voisine de 600 mg pour 100 g de viande. La différence essentielle se situe donc au niveau des triglycérides (1,8 g/100 g pour l'adulte contre 1,0 g/100 g pour le taurillon : non significatif au seuil de 5 p. 100, $t = 1{,}885$). On note toutefois, tant pour les lipides totaux que pour les fractions phospholipidique et triglycéridique, que la variabilité des teneurs est plus importante dans la viande d'animal adulte.

L'étude de la composition en acides gras de la fraction phospholipidique ne permet de mettre en évidence aucune différence. Au niveau de la fraction triglycéridique, des différences significatives au seuil de 5 p. 100 apparaissent pour les acides myristique, palmitoléique et palmitolique, la viande de taurillon contenant des quantités supérieures de ces composants.

2. — *Analyse sensorielle*

2.1. — *Identification de l'échantillon unique*

En moyenne, lors du test triangulaire, l'échantillon unique est reconnu par 79,5 p. 100 des dégustateurs ce qui, en se référant à la table de Roessler *et al.*

TABLEAU 5

Résultats de l'analyse sensorielle (étude par couples)

N° couple	Reconnaissance échantillon unique (%)		Tendreté V	Tendreté T	Succulence V	Succulence T	Flaveur V	Flaveur T
1	100 SSS	n . . .	12		12		12	
		$\bar{x}$ . . .	6,75	6,83	6,92	5,63	7,00	5,08
		s	1,37	0,94	1,78	0,88	1,71	0,63
		t	0,177	NS	2,699	S	3,754	SS
2	81 SSS	n . . .	13		13		13	
		x . . .	6,65	7,03	6,77	5,96	7,23	6,28
		s	0,83	0,72	1,58	1,14	0,78	0,99
		t	1,059	NS	1,968	NS	2,846	S
3	100 SSS	n . . .	16		16		16	
		$\bar{x}$ . . .	7,63	6,78	6,63	5,75	7,09	6,28
		s	1,50	1,24	1,07	1,06	1,27	0,77
		t	1,920	NS	2,597	S	2,819	S
4	75 SSS	n . . .	12		12		12	
		$\bar{x}$ . . .	7,75	7,67	7,88	7,17	7,17	5,96
		s	0,87	1,44	1,09	1,19	0,96	1,21
		t	0,289	NS	2,837	S	4,994	SSS
5	75 SSS	n . . .	12		12		12	
		$\bar{x}$ . . .	5,54	7,50	6,04	5,04	5,42	3,72
		s	1,36	1,43	1,32	1,60	1,08	1,82
		t	6,434	SSS	2,872	S	3,350	SS
6	87,5 SSS	n . . .	14		14		14	
		$\bar{x}$ . . .	9,46	8,35	6,64	6,86	5,00	5,50
		s	0,63	0,74	1,54	1,57	1,57	1,09
		t	6,621	SSS	0,822	NS	1,613	NS
7	100 SSS	n . . .	16		16		16	
		$\bar{x}$ . . .	6,97	7,03	6,50	6,13	6,50	5,34
		s	1,07	1,04	0,98	0,92	1,08	1,33
		t	0,246	NS	1,596	NS	3,831	SS
8	100 SSS	n . . .	16		16		16	
		$\bar{x}$ . . .	7,84	5,00	6,31	5,31	7,38	4,88
		s	0,75	1,32	0,68	1,08	1,35	1,31
		t	9,763	SSS	3,508	SS	6,692	SSS
9	50 NS	n . . .	8		8		8	
		$\bar{x}$ . . .	5,75	7,25	6,18	6,90	6,75	7,50
		s	1,04	0,85	1,19	1,28	1,04	0,76
		t	3,464	SS	3,116	SS	2,393	S
10	68,75 SS	n . . .	11		11		11	
		$\bar{x}$ . . .	5,68	5,13	4,73	4,36	4,64	4,27
		s	1,40	1,05	1,40	1,12	0,67	0,90
		t	1,517	NS	0,952	NS	1,305	NS
11	41,7 SSS	n . . .	5		5		5	
		$\bar{x}$ . . .	6,10	5,20	5,40	4,40	6,10	5,60
		s	1,14	1,92	1,14	1,82	1,67	1,14
		t	1,068	NS	1,414	NS	0,791	NS
12	75 SSS	n . . .	9		9		9	
		$\bar{x}$ . . .	5,22	7,89	5,33	6,55	5,78	6,11
		s	1,56	0,93	1,50	1,01	0,83	1,90
		t	5,334	SSS	1 846	NS	0,436	NS

(1943) montre qu'il existe, entre la viande d'adulte et celle de taurillon une différence significative au seuil de 1 p. 1 000.

Si on examine ces résultats par couple (tabl. 5) on constate que la différence est significative au seuil de 1 p. 1 000 dans 9 cas sur 12, au seuil de 1 p. 100 dans 1 cas sur 12 et non significative dans 2 cas.

2.2. — *Tendreté*

Globalement on peut considérer que les notes obtenues par les deux types de viande ne diffèrent pas; les valeurs moyennes sont respectivement de 6,89 pour le taurillon et de 6,92 pour l'adulte et la différence n'est pas significative (tabl. 6).

TABLEAU 6

Résultats globaux de l'analyse sensorielle

		Nombre de couples de notes	$\bar{x}$	s	t
Tendreté	V	144	6,92	1,61	0,198 NS
	T		6,89	1,53	
Succulence	V	144	6,38	1,45	4,194 SSS
	T		5,89	1,41	
Flaveur	V	144	6,40	1,48	6,729 SSS
	T		5,49	1,47	

De plus, les écarts-types sont très voisins et par conséquent la variabilité du caractère est sensiblement la même dans les deux types de viande. Si on considère (tabl. 7) le nombre total de dégustateurs ayant jugé l'un des deux types de viande plus tendre, il se confirme qu'il n'y a pas de différence de tendreté.

Considérés par couples (tabl. 5) les résultats montrent que dans 6 cas sur 12, le taurillon est jugé plus tendre, mais dans 3 cas la différence est non significative, dans un cas elle est significative, à P = 0,01 et dans 2 cas à P = 0,001. Dans les 6 autres cas, la viande de vache est jugée plus tendre, mais la différence n'est significative à P = 0,001 que dans 2 cas et non significative dans 4 cas. Ces résultats confirment la grande variabilité entre animaux pour un même muscle, du caractère tendreté.

2.3. — *Succulence*

Les moyennes des notes montrent une différence significative à P = 0,001 de 0,5 point à l'avantage de la viande d'adulte. Cette différence est également très

TABLEAU 7

Résultats de l'analyse sensorielle (classement)

Nombre de dégustateurs ayant jugé que la viande de viande de vache est		Signification	
		sans tenir compte des jugements ex aequo	en répartissant également les jugements ex aequo
De tendreté supérieure	64		
inférieure	56	P = 0,26	P = 0,28
égale	24	NS	NS
De succulence supérieure	76		
inférieure	34	$P < 4\ 10^{-5}$	$P < 3\ 10^{-4}$
égale	34	SSS	SSS
De flaveur supérieure	85		
inférieure	27	$P < 1\ 10^{-6}$	$P < 1\ 10^{-5}$
égale	32	SSS	SSS
De qualité globale			
supérieure	87		
inférieure	29	$P < 1\ 10^{-6}$	$P < 1\ 10^{-5}$
égale	28	SSS	SSS

à la viande de taurillon

sensible si nous considérons (tabl. 7) que 76 dégustateurs ont jugé la viande de vache plus succulente alors que 34 ont donné cet avantage à la viande de taurillon. Si nous considérons les résultats par couples, la viande de taurillon est jugée supérieure à la viande d'adulte dans 3 cas sur 12, mais la différence n'est significative que dans 1 cas. Par contre, parmi les 9 cas où la viande de vache est jugée supérieure la différence est significative dans 5 cas.

2.4. — *Flaveur*

Au niveau de ce caractère la différence est encore plus marquée. Les moyennes des notes sont séparées par une différence de 0,9 points (significative à 1 p. 1 000) à l'avantage de la viande de vache. Les résultats du tableau 7 vont dans le même sens avec 85 dégustateurs contre 27 ayant jugé la viande de vache supérieure.

Par couples, si la viande de taurillon reçoit une note supérieure dans 3 cas, la différence n'est significative que dans 1 cas, alors que lorsque la viande de vache est jugée supérieure (9 cas sur 12) la différence est significative dans 7 cas.

3. — *Relation entre qualités organoleptiques et caractères physiques et physicochimiques*

Par le calcul des coefficients de corrélation, l'existence de relations entre l'appréciation des qualités organoleptiques et les propriétés mécaniques des muscles considérés ainsi que certaines caractéristiques de composition, a été recherchée et leur signification étudiée. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8.

TABLEAU 8

Relations entre les qualités organoleptiques et quelques qualités physiques et chimiques des viandes étudiées — Seuil de signification S 5 p. 100; SS 1 p. 100

Corrélations entre	Ensemble vaches et taurillons
Tendreté / F	— 0,14 NS
Tendreté / W	— 0,49 S
Tendreté / W / F	— 0,64 SS
Flaveur / succulence	0,67 SS
Succulence / rétention eau	— 0,32 NS
Flaveur / p. 100 déphosphorylation	0,27 NS
Flaveur / pigments	0,51 SS
Flaveur / lipides totaux	0,47 S
Flaveur / lipides neutres	0,48 S
Pigments / lipides totaux	0,58 SS
Pigments / lipides neutres	0,55 SS

Discussion

Les viandes de taurillon se caractérisent par une teneur en pigments nettement inférieure à celles d'adulte et cependant, cette différence n'a pas une influence très marquée sur les caractéristiques de couleur de la viande crue; ceci peut s'expliquer d'une part par l'hétérogénéité des races pour l'ensemble des animaux et de l'âge pour les vaches, et d'autre part, par le fait que les mesures de réflectance intègrent à la fois la teneur en pigments et la structure de la surface du muscle : l'absorption plus élevée, pour une teneur en pigments donnée, peut être la conséquence d'une structure plus lâche de la viande de taurillon, masquant partiellement l'effet de la différence de teneur en pigments.

La préférence des dégustateurs va, globalement, à la viande des animaux âgés, puisque 87 dégustateurs préfèrent la viande d'adulte, 29 celle de taurillon et 28 les classent à égalité. Sur les 12 couples considérés, la viande de vache est préférée 9 fois, et celle de taurillon 3 fois. En analysant en détail les notes attribuées à chaque échantillon pour chacune des caractéristiques considérées on observe que la notion de préférence globale est systématiquement associée à une supériorité des caractères de succulence et de flaveur, alors que dans la moitié des cas, l'échantillon préféré est celui qui est jugé le moins tendre des deux. Il semble donc que

dans nos conditions, le facteur tendreté ne soit pas le plus important dans le déterminisme du jugement du dégustateur. Il faut noter cependant que la comparaison portait sur des échantillons de muscle *Longissimus dorsi* bien maturés et donc relativement tendres.

On peut donc logiquement penser que si la tendreté est le facteur limitant lorsqu'elle est faible, elle devient secondaire dès qu'elle atteint un seuil suffisamment élevé rendant la mastication aisée et qu'alors la succulence et la flaveur deviennent prépondérantes.

Il faut cependant noter que, dans les trois cas où la viande de taurillon a été préférée (couples n° 6, 9 et 12) les échantillons correspondants de viande d'adulte montraient des teneurs en pigments relativement basses. Or, on observe (tabl. 8) un coefficient de corrélation significatif à 5 p. 100 entre note de flaveur et teneur en pigment. Faut-il voir là une influence directe de la couleur sur le jugement porté par les dégustateurs, ou indirecte par le biais de la teneur en lipides.

Certains auteurs ayant comparé des animaux couvrant une gamme d'âge plus réduite n'ont pas noté de différences aussi nettes (FIELD, 1971; ALBAUGH *et al.*, 1975) ; toutefois nos résultats sont en accord avec ceux de BRYCE-JONES *et al.* (1964) et de REAGAN *et al.* (1971). Enfin on peut noter que dans l'absolu les différences enregistrées restent limitées et que pour les taurillons, les notes témoignent d'un niveau moyen très acceptable.

Au-delà de la comparaison vache-taurillon, il est intéressant de discuter les résultats du tableau 8.

Les notes de tendreté ne sont pas reliées significativement à la force maximum de cisaillement, essentiellement représentative, dans une viande maturée, de la teneur en tissu conjonctif; la liaison est plus étroite avec le travail de cisaillement W, et surtout avec le rapport W/F*e*, qui est lui-même en relation avec les critères biochimiques d'appréciation de l'état de maturation de la viande (VALIN *et al* 1975). Il se confirme donc que pour une viande relativement pauvre en tissu conjonctif, l'appréciation subjective de la tendreté est dépendante de l'état de maturation. L'existence d'une relation significative entre la flaveur et la jutosité peut indiquer qu'une partie des substances responsables de la flaveur est contenue dans le jus. Il se peut aussi que la jutosité puisse être considérée comme un marqueur du degré de cuisson et il est bien connu qu'une viande trop cuite a une flaveur faible.

On aurait pu s'attendre à ce que la jutosité de la viande cuite soit en relation avec le pouvoir de rétention d'eau déterminé par pression sur le muscle cru. En fait, la relation est lâche et non significative et il faudrait probablement pouvoir tenir compte des pertes à la cuisson, qui n'ont pas été contrôlées. Le pourcentage de déphosphorylation des nucléotides qui, dans la viande en cours de maturation, constitue une bonne estimation de la teneur en IMP résiduel n'est pas non plus significativement relié à la flaveur, ce qui confirme les résultats obtenus par RHODES (1965).

L'examen de la relation existant entre l'état d'engraissement et la flaveur de la viande a particulièrement retenu notre attention. En effet, alors qu'un bon état d'engraissement est considéré comme une garantie de bonne flaveur, par la majorité, sinon la totalité des professionnels de la viande, les résultats de la littérature ne le confirment nullement et les corrélations rapportées entre teneur en gras intramusculaire et flaveur sont lâches ou pratiquement inexistantes (JEREMIAH *et al.*, 1970; TUMA *et al.*, 1962).

Nos résultats montrent que l'amélioration de la flaveur avec l'augmentation de teneur en lipides diminue au fur et à mesure que la teneur en lipides augmente

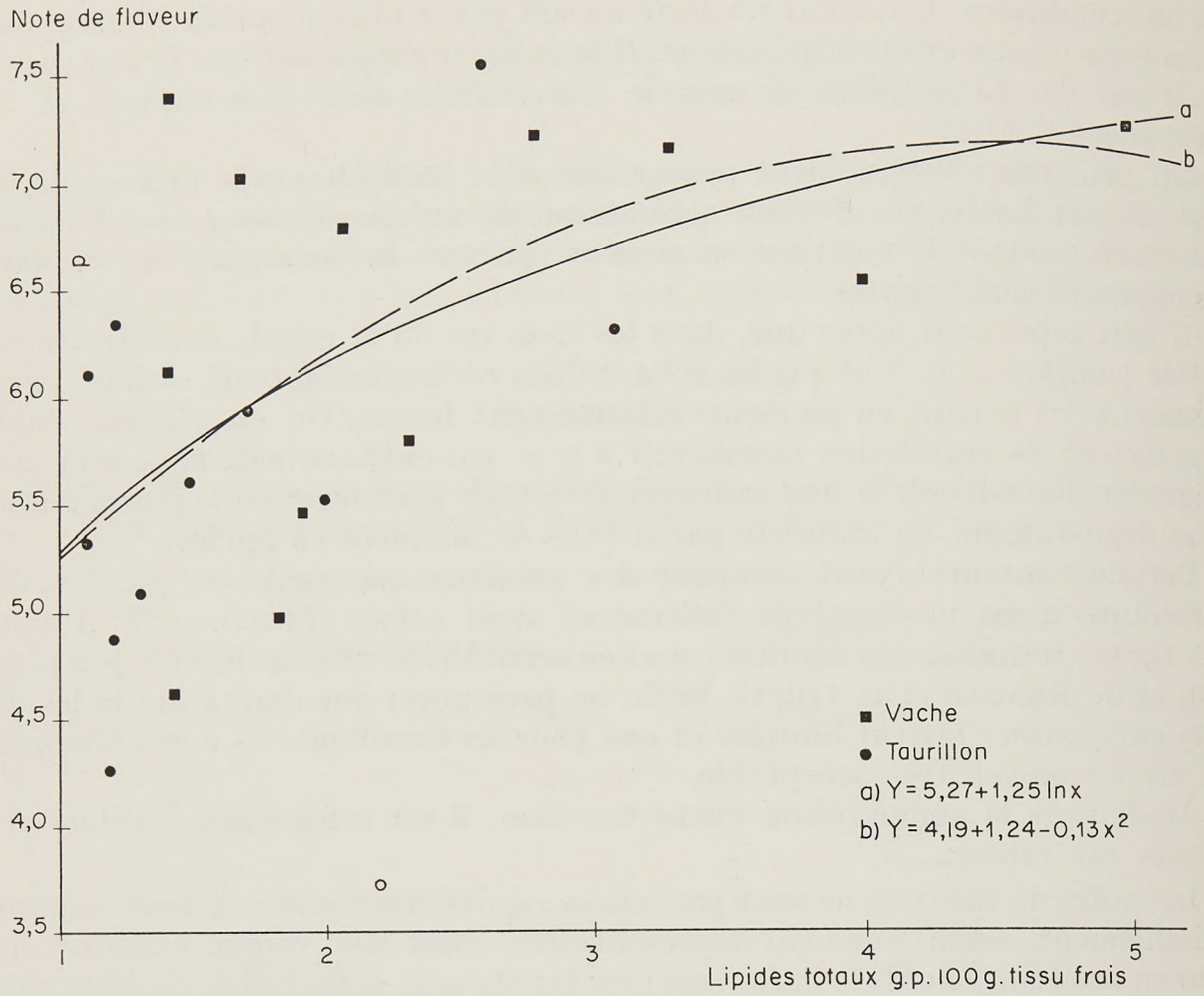


FIG. 1. — *Relation entre la note de flaveur et la teneur en lipides intramusculaires totaux.*

(fig. 1). A partir de nos données expérimentales les meilleurs ajustements pour la relation entre flaveur (y) et teneur en lipides (x) sont du type :

(a) $$y = 5{,}27 + 1{,}25 \mathrm{L}nx$$

ou :

(b) $$y = 4{,}19 + 1{,}25x - 0{,}13x^2$$

Dans les deux cas, la corrélation entre les deux grandeurs liées par les relations (a) et (b) est égale à 0,57, la probabilité pour (a) étant toutefois meilleure, 0,004 contre 0,02 pour (b). Le manque des données expérimentales pour les teneurs élevées en lipides ne permet pas de choisir entre ces deux types de relation.

Globalement on tend donc vers une valeur limite et il est possible que pour des teneurs en lipides supérieures à celles que nous avons observées nous obtiendrions une baisse des notes de flaveur (relation b). On peut noter que l'optimum de flaveur est pratiquement atteint dès que la teneur en lipides totaux, pour le muscle considéré est de l'ordre de 3,5 p. 100. La corrélation significative que nous observons entre flaveur et teneur en lipides totaux est comparable voire un peu plus étroite que celle rapportée par RHODES (1973) ($r^2 = 0{,}25$) pour des animaux abattus au même âge à différents états d'engraissement.

Si nous faisons abstraction des phospholipides dont la teneur est d'ailleurs relativement constante dans les deux types de viande, nous observons l'existence d'une corrélation du même ordre entre la flaveur et la teneur en lipides neutres. Il faut noter cependant que les relations entre les notes de flaveur et les teneurs

en lipides (totaux ou neutres) sont nettement plus lâches dans la population des taurillons, probablement en raison d'une relative constance de la teneur en lipides dans ces derniers.

Bien qu'il ne soit pas possible, la distribution des âges de l'ensemble des animaux ne suivant pas une loi normale, de calculer les coefficients de corrélation entre l'âge d'une part, la teneur en pigment et la note de flaveur d'autre part, pour l'ensemble de la population, ces calculs effectués séparément pour les vaches et les taurillons montrent que les relations sont très lâches, voire inexistantes. On ne peut donc pas attribuer la relation entre pigments et flaveur à un effet de l'âge. Cependant, comme il existe également une relation significative entre les teneurs en pigments et en lipides, pour l'ensemble des animaux, on peut penser que la teneur en pigments ne serait pas en relation directe avec la flaveur, mais constituerait un marqueur de la teneur en lipides et peut-être peut-on considérer que la relation pigments / flaveur ne fait que traduire une influence du type métabolique des fibres musculaires sur l'intensité de la flaveur. Il a d'ailleurs été montré (FIEHM et PETER, 1963) que les fibres musculaires de type rouge à métabolisme aérobie avaient une teneur en lipides supérieure. En outre, il est bien établi que si pour un muscle donné, en l'occurence le *Longissimus dorsi*, le type métabolique n'évolue pas avec l'âge, il existe par contre une très large variabilité de type entre animaux (LACOURT, 1973). S'il en est ainsi il y aurait peut-être là une voie possible de recherche de tests de prédiction de la flaveur des viandes bovines.

Conclusion

Il ressort de cette étude que d'incontestables différences de qualités organoleptiques existent entre la viande de vache et celle de taurillon. Cette dernière présente une nette déficience de coloration et une teneur en lipides intramusculaires plus faible, ce qui affecte les caractéristiques de flaveur et de succulence.

Sur le plan de la tendreté, malgré la grande différence d'âge des animaux comparés, la viande des taurillons n'est pas plus tendre que celle des vaches de réforme ce qui confirme des résultats connus (DUMONT, 1971). Par ailleurs KOPP (1971) a montré que malgré leur jeune âge, le collagène endomysial de taurillons âgés de 15 mois présente un degré de polymérisation proche de celui de l'adulte. En outre, la comparaison a porté sur le *Longissimus dorsi*, muscle tendre.

Cette étude nous a également permis de préciser la relation existante entre la flaveur et la teneur en lipides d'une part en montrant que la teneur optimale en lipides intramusculaires totaux est relativement basse et voisine de 3,5 p. 100 pour le muscle considéré et d'autre part en mettant l'accent sur le parallélisme des relations flaveur lipides et flaveur pigments. Enfin, l'hypothèse d'une relation entre la flaveur et le type métabolique des fibres musculaires peut être avancée.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciements

Les auteurs remercient R. PION, J. PRUGNAUD, du laboratoire d'Études du Métabolisme Azoté, pour les déterminations relatives aux acides aminés, ainsi que C. TOURAILLE, de la Station de Recherches sur la Viande, pour ses conseils dans l'exploitation des résultats d'analyse sensorielle.

Summary

Study of bovine meat quality
II. — Comparison of the organoleptic properties of cow and young bull meat

A comparative study of the organoleptic properties of cow and young bull meat was undertaken.

After a nine days aging period at + 4 °C, differences appear between the composition of the two types of beef meat. In cow meat it exists a higher amount of pigments, a higher level of residual glycogen at equal ultimate pH, a lower percentage of nucleotide dephosphorylation and a higher amount of neutral intra-muscular lipids.

The main quality differences affect flavour. Young bull meats are less tasty and juicy than cow meats.

For all the samples studied a significant correlation exists between flavour and the amount of neutral lipids. The analysis of the relations between pigments and flavour on one hand pigments and neutral lipids on the other hand, allows the hypothesis of an effect of the metabolic types of the muscle fibers on the intensity of meat flavour.

Références bibliographiques

ALBAUGH A., CARROLL F. D., ELLIS K. W., ALBAUGH R., 1975. Comparison of carcasses and meat from steers, short scrotum bulls and intact bulls. *J. Anim. Sci.*, **41** (6), 1627-1631.

BERGMEYER H. U., 1963. Methods of enzyme analysis — Academic Press N. Y.

BRYCE JONES K., HARRIES J. M., ROBERTSON J., AKERS J. M., 1964. Studies in beef quality IV. — A comparison of the eating quality of meat from bulls and steers. *J. Sci. Fd Agric.*, **15**, 790-799.

DUMONT B. L., 1971. Meat toughness index of beef carcasses. *17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers*, Bristol.

FIEHN W., PETER J. B., 1973. Lipid composition of muscles of Nearly Homogeneous Fiber type. Exp. Neurol., **39**, 372-380.

FIELD R. A., 1971. Effect of castration on meat quality and quantity. *J. Anim. Sci.*, **32**, (5) 849-858.

FOLCH J., LEES M., SLOANE STANLEY G. H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-499.

GOUTEFONGEA R., Étude comparative de différentes méthodes de mesure du pouvoir de rétention d'eau de la viande de porc. *Ann. Zootechn.*, **15**, 291-295.

HORNSEY K. C., 1956. The colour of cooked cured pork. I. Estimation of the nitric oxide haem pigments. *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 534-540.

HUGUETT A. S. G., NIXON D. A., 1957. Use of glucose oxidase, peroxidase and o. dianisin in determination of blood and urinary glucose. *Lancet*, **2**, 368-370

JEREMIAH L. E., CARPENTER Z. L., SMITH G. C., BUTLER O. D., 1970. Cited by PATTERSON R. L., 1974. The flavour of meat in « MEAT » Édited by COLE D. J. A. and LAWRIE R. A. Butterworths London.

KOPP J., 1970. Évolution qualitative du collagène musculaire de bovin en fonction de l'âge des animaux, conséquences sur la tendreté de la viande. Bull. Techn. INRA THEIX n° 5, 47-55.

LACOURT A., 1973. Évolution avec l'âge des caractéristiques métaboliques et contractiles des muscles de bovins. 19th Europ. Meet. of Meat Workers, Paris.

MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN W. H., 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Analyt. Chem.*, **30**, 1185-1190.

PAWLAK M., PION R., 1968. Influence de la supplémentation des protéines du blé par des doses croissantes de lysine sur la teneur en acides aminés libres du sang et du muscle du rat en croissance. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 517-530.

REAGAN J. O., CARPENTER Z. L., SMITH G. C., KING G. T., 1971. Comparison of palatability traits of beef produced by young bulls and steers. *J. Anim. Sci.*, **32** (4), 641-646.

RENERRE M., VALIN C., 1976. Influence de l'âge sur la couleur des viandes des taurillons de race Limousine. 22nd Europ. Meet. of Meat Res. Workers-Malmö.

RHODES D. N., 1965. Nucleotide degradation during the extended storage of lamb and beef. *J. Sci. Fr Agric.*, **16**, 447-451.

RHODES D. N., 1973. Cited by PATTERSON R. L. S., 1974. The flavor of meat in « MEAT » Edited by COLE D. J. A. and LAWRIE R. A., Butterworths. London.

ROESSLER E. B., WARREN J., GUYMON J. F., 1948. Significance in the triangle taste tests. *Food Research*, **13**, 503-505.

SALE P., 1971. Évolution de quelques propriétés mécaniques du muscle pendant la maturation. *17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers*, Bristol.

SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt. Chem.*, **30**, 1190-1206.

TARLAGIS B. G., PEARSON A. M., DUGAN L. R., 1964. Chemistry of the 2 Thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 602-607.

TUMA H. J., HENRICKSON R. L., STEPHENS D. F., MOORE R., 1962. Influence of marbling and animal age on factors associated with beef quality. *J. Anim. Sci.*, **21**, 848-851.

VALIN C., CHARPENTIER J., 1969. Catabolisme *post mortem* des nucléotides acido solubles libres et liés du muscle de bovin. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **9** (4), 555-562.

VALIN C., PALANSKA O., GOUTEFONGEA R., 1975. Étude de la qualité des viandes de bovins. I. — Étude biochimique de la maturation des viandes de taurillon. *Ann. Technol. Agric.*, **24**, 47-64.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 629-654.

Présence de flavonoides *Sensu stricto* (Flavones et coumestanes) dans des préparations de protéines extraites de luzerne (*Medicago sativa* var. Europe)

B. MONTIES et J.-C. RAMBOURG (*)

Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysiologie, I.N.R.A., Institut National Agronomique, Centre de Grignon 78850 Thiverval-Grignon (France)

Résumé

Il existe des polyphénols de type flavonoïde *sensu stricto* (flavonosides et coumestanes dans les préparations protéiques isolées après broyage des jus des parties aériennes de luzernes variété Europe.

Une fraction de ces flavonoïdes est complètement extractible; elle donne lieu au phénomène de « compartimentation » : un même polyphénol peut être extrait par deux solvants différents employés successivement.

Une seconde fraction n'est extractible qu'après traitement de solubilisation à chaud des protéines par le bromure d'acétyle dans l'acide acétique glacial puis hydraté.

Quelque soit le mode de préparation des protéines (précipitation par chauffage ou par addition de solvants organiques aux jus) les teneurs, par rapport à la matière sèche, sont de l'ordre de 10^{-3} en flavones et de 10^{-6} en coumestanes. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de flavanoïdes ni de tanins. Seules des traces d'acide chlorogénique ont été observées.

Ces résultats confirment la possibilité d'existence de sites d'adsorption spécifique de polyphénols sur les protéines et d'une variabilité de l'équipement polyphénolique des cultivars de luzernes.

Mots-clés : *Protéines, Isolat protéique, Concentrat protéique, Flavones, Tricine, Isoflavones, Coumestanes, Coumestrol, Acide chlorogénique, Tanins condensés, Tanins hydrolysables, Flavane, Catéchine, Luzerne, Cultivar.*

(*) Stagiaire à l'I.N.A., chimiste à la Société France Luzerne, Route de Suippes, 51008 Châlons-sur-Marne Cedex, France.

Introduction

Durant ces dernières décennies, la pénurie croissante en protéines a conduit à essayer de préparer des protéines végétales directement consommables par l'homme. En effet, le rendement de transformation des protéines végétales en protéines animales reste faible même par des animaux sélectionnés (FAUCONNEAU, 1976) et donc l'utilisation directe par l'homme de ces protéines permettrait une meilleure valorisation des productions végétales.

Les plantes fourragères sont des sources possibles de protéines parce qu'elles ont des rendements protéiques à l'hectare élevés. Parmi elles, la luzerne (Medicago sativa, sp) est particulièrement intéressante pour de nombreuses raisons : son rendement en protéine à l'hectare est des plus élevés, c'est une culture pérenne, elle est adaptée aux latitudes européennes, elle valorise l'azote atmosphérique, enfin, elle permet de produire *à la fois* du fourrage deshydraté, équilibré en protéines et des préparations protéiques concentrées; enfin, le couplage de ces deux opérations rentabilise mieux le coût énergétique de la deshydratation (STAHMANN, 1968).

Lorsque l'on compare la valeur alimentaire des préparations protéiques, disponibles actuellement, on constate que la valeur alimentaire des préparations protéiques de luzerne est faible et qu'elle mérite d'être améliorée. En effet, alors que leurs coefficients d'utilisation digestive sont, en général faibles, elles sont de bonne qualité du point de vue acides aminés indispensables (STAHMANN, 1968; FAUCONNEAU, 1976). C'est sûrement là, la raison pour laquelle, MYERS *et al.* (1975) ont obtenu avec des porcelets recevant une ration de base « à l'orge » supplémentée soit en concentré protéique de luzerne du commerce soit en farine de soja, des croissances « excellentes et comparables ». Par contre, lorsque la même comparaison a été faite avec des rats, les performances « sur luzerne » ont été moins bonnes (CHEEKE et MYERS, 1975) : des facteurs technologiques, modalités de séchage du concentré, seraient en partie responsables de ces différences (MYERS et CHEEKE, 1975).

Indépendamment de ces facteurs technologiques, il est aussi très vraisemblable que des produits toxiques tels que des polyphénols, et certains glucides (FAUCONNEAU, 1976), sont aussi responsables de ces mauvaises performances. De façon systématique, et même parfois *a priori*, ces effets toxiques sont attribués à des tanins. Les tanins sont en effet des polymères polyphénoliques dont la propriété caractéristique est de se lier aux protéines. De très nombreux travaux ont été consacrés à la formation de ces associations. L'un d'entre nous a discuté le mécanisme des réactions d'oxydations couplées (MONTIES, 1966*b*), qui aboutit à la formation de complexes par liaisons covalentes. A côté de ce mécanisme, dont la généralité est maintenant bien démontrée (Mc GUINNESS *et al.*, 1975; HEATERBELL, 1976), il ne faut pas sous-estimer les formations de complexes par liaisons non-covalentes (liaisons hydrogène, HASLAM, 1974) qui se formeraient spécifiquement entre les fonctions orthodiphénol des tanins et les groupements céto-imide protéiques. Parmi les nombreuses revues consacrées à ces liaisons, nous ne citerons que celle de SYNGE (1975) parce qu'elle concerne tout particulièrement les préparations protéiques de feuilles. Dans cette revue l'auteur distingue très nettement les deux types de polyphénols capables de se lier aux protéines : d'une part *les polymères polyphénoliques ou tanins*, et d'autre part, *les polyphénols monomères ou non-tanins*. Par polyphénols monomères, on doit entendre les polyphénols possédant un

squelette carboné contenant moins de 15 atomes de carbone. Parmi ceux-ci figurent les flavonoïdes *sensu stricto*, par exemple les flavones ou les coumestanes qui possèdent des hétérocycles γ- ou α-pyrone, et les flavanoïdes, tels les catéchines et proanthocyanes à hétérocycle pyranique. La présence de certains de ces monomères, ainsi que celle de tanins condensés et hydrolysables, ayant été rapportée dans les parties aériennes de la luzerne, nous avons schématisé dans la figure 1 la structure de ces polyphénols ainsi que leurs relations biosynthétiques.

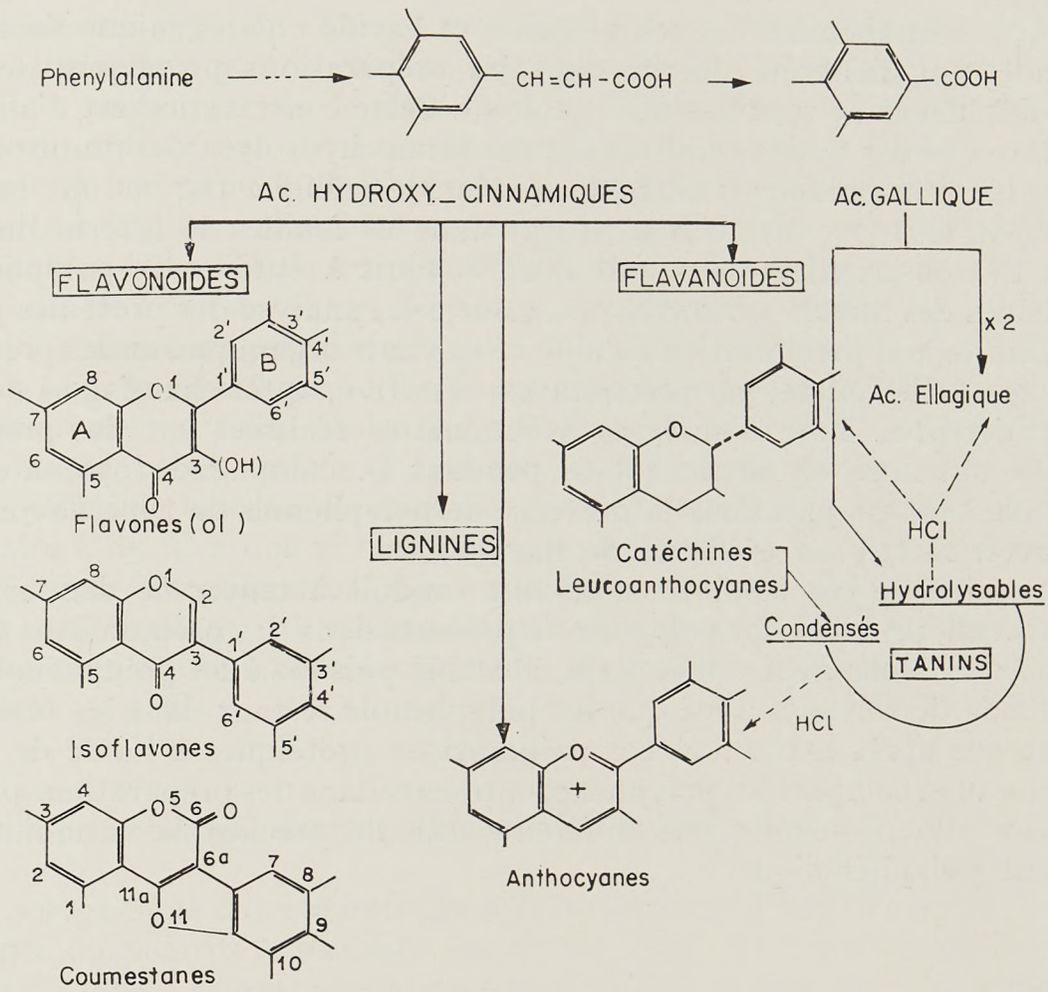


FIG. 1. — *Structure et relations biosynthétiques entre les principaux types de polyphénols décrits dans la luzerne.*

Les flèches continues schématisent les relations biosynthétiques et les tirets les transformations *in vitro* en milieu acide.

L'acide chlorogénique, non représenté, est l'acide 3-cafeoylquinique ou 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinique.

La structure du coumestrol et des flavones et isoflavones des luzernes sont données en légende de la figure 2 et dans le tableau 4 respectivement.

A notre connaissance, aucun bilan systématique de l'ensemble des polyphénols, monomères et polymères, liés aux protéines de luzerne n'a été établi.

Seules les présences de coumestrol et d'acide chlorogénique ont été rapportées. L'existence de coumestrol (fig. 1) dans les préparations protéiques de luzerne, de soja et de six autres végétaux a été établie récemment par KNUCKLESS *et al.* (1976). Ces mêmes auteurs ont, de plus, émis l'hypothèse que des composés polyphénoliques, du type acide chlorogénique, présents dans les jus, seraient oxydés par des polyphénoloxydases et donneraient, après réaction d'oxydation couplée,

des produits bruns, responsables de la couleur des préparations protéiques de luzerne (EDWARDS *et al.*, 1975). Quand à la présence d'acide chlorogénique, elle a été décrite dans les jus de feuilles de luzerne, variété Dawson par FREE et SATTERLEE (1975) ainsi que dans des préparations protéiques isolées de ces jus (LAHIRY et SATTERLEE, 1975). Ces auteurs ont dosé l'acide chlorogénique grâce à la réaction de HOEPFNER (1932) mais selon un protocole modifié par POMENTA et BURNS (1971); ils ont ainsi pu rapporter l'existence d'une fraction protéique de faible poids moléculaire capable de lier spécifiquement l'acide chlorogénique (LAHIRY *et al.*, 1977).

A notre connaissance, les coumestanes et l'acide chlorogénique sont les seuls polyphénols qui aient été décrits dans les préparations protéiques de luzerne. Or ces polyphénols ne sont pas des « tanins ». Cette constatation est d'autant plus surprenante que des tanins condensés et des tanins hydrolysables (tanins galliques) ainsi que leurs monomères : catéchines et acide gallique (fig. 1) ont été mis en évidence (MILIC, 1972; MILIC *et al.*, 1972) dans les feuilles de luzerne du cultivar Panonia. Ces observations nous ont donc conduit à étudier les polyphénols liés aux protéines des luzernes. Nous avons, pour cela, analysé des protéines préparées au Laboratoire, par précipitation à l'aide de solvants organiques et des préparations obtenues en atelier-pilote, par précipitation sélective, après chauffage à des températures différentes. Lors d'analyses préliminaires réalisées sur des préparations protéiques obtenues en atelier-pilote pendant la campagne 1976, nous avons constaté dans ces préparations la présence de polyphénols de type flavonoïdes (*) sans pouvoir mettre en évidence de flavanoïdes.

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à tenter de dresser, dans le présent travail, un bilan des polyphénols présents dans des préparations de protéines de luzerne. Nous avons donc isolé, identifié puis dosé les polyphénols extractibles à l'aide de solvants ainsi que les polyphénols restant dans les résidus insolubles obtenus après extraction des préparations protéiques à l'aide de solvants. Nous avons aussi comparé les polyphénols présents dans des préparations protéiques isolées selon des protocoles très différents afin de préciser la variabilité de cet équipement polyphénolique.

Matériel et méthode

Les préparations de protéines ont été faites au laboratoire à partir de luzerne variété Europe, récoltée en début de floraison sur des repousses de luzernières installées en plein champ depuis 2 ans à Grignon. Les préparations faites à l'usine-pilote ont été obtenues à partir de mélanges de luzernes (principalement Europe) récoltées dans les environs de Chalons-sur-Marne.

Les préparations faites au laboratoire ont été obtenues par précipitation en milieu organique : pour cela on broie 50 g de feuilles dans 250 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0. Le broyat, filtré sur gaze, est clarifié par centrifugation (400 g, 10 mn); 100 ml du jus clair sont ensuite injectés à l'aide d'une seringue dans 700 ml de solvant organique, sous agitation magnétique rapide. Après 2 h d'attente à la température choisie, les protéines précipitées sont récupérées par

(*) En accord avec SWAIN (1976) nous distinguerons strictement par la suite les flavanoïdes et les flavonoïdes selon la structure de leur hétérocycle, comme nous l'avons fait plus haut et comme nous avions proposé de le faire systématiquement (MONTIES, 1966*a*).

centrifugation (10 000 g, 20 mn). Le culot lavé au moyen du solvant, puis lyophilisé, constitue la préparation protéique. Quatre échantillons ont été préparés. Deux échantillons, L_1 et L_2, ont été obtenus par précipitation dans l'acétone à température voisine de 20 °C (L_1) et à + 4 °C (L_2) à partir de luzernes en bon état sanitaire, récoltées début septembre 1976. Deux autres échantillons, L_3 et L_4, ont été préparés à partir de luzernes en très mauvais état sanitaire, courant octobre : les protéines ont été précipitées à température ambiante soit dans l'acétone (L_3) soit dans l'éthanol à 95° (L_4). Les préparations de concentrats et isolats (FAUCONNEAU, 1976) ont été obtenus à l'usine par précipitation à chaud selon des protocoles du type Pro-Xan et Pro-Xan II (EDWARDS *et al.*, 1975) : ce dernier protocole diffère très peu de celui proposé par ROUELLE, dès 1773, pour isoler les préparations protéiques de feuilles qu'il nommait alors « matière glutineuse ». Le jus vert, obtenu par pressage hydraulique de luzernes broyées, est chauffé rapidement et maintenu à 85 °C pendant 5 min. Après centrifugation, on obtient un concentrat (P_1) de « protéines vertes » contenant 60 p. 100 de protéines (N × 6,25). D'autres échantillons ont été obtenus par « trempage » : les luzernes sont broyées dans de l'eau à 50°, 55 °C pendant 5 min (proportions en poids = 1/6). Après avoir éliminé un premier précipité de « boues vertes » par chauffage à 60 °C pendant 5 min, le « jus brun » clarifié est chauffé comme précédemment à 85 °C : on obtient un précipité (P_2), isolat de protéines blanches qui est récupéré par centrifugation. Deux autres isolats (P_3) et (P_4) ont été obtenus aussi par trempage à partir de 50 kg de luzerne donnant 190 l de jus brun. Une première aliquote de ce jus traité à 85 °C a donné l'isolat (P_3) homologue de P_2. Une seconde aliquote concentrée par ultrafiltration (sur membrane imperméable aux protéines de PM > 15 000) pendant 7 h à température voisine de 45 °C, a donné l'isolat P_4. Toutes ces préparations ont été stockées, après lyophilisation, à température au plus égale à + 4 °C.

A. — *Analyse des polyphénols extractibles à l'aide de solvants*

Les polyphénols ont été extraits soit de façon progressive à l'aide d'une série de solvants de polarité croissante (MONTIES, 1971, 1975*b*), soit directement par reflux sous azote. Les extractions progressives sont faites, soit sur colonne, après dispersion de 500 mg de protéines dans 25 ml de sable lavé, soit par broyages répétés (3 fois 1 min à 20 000 t/min) de 1 g de protéine par fractions de 50 ml de solvant. Dans tous les cas la séquence des solvants est la suivante : 1) pentane à 2 p. 100 de méthanol; 2) éther éthylique; 3) méthanol; 4) eau. Au maximum, 4 fractions de 50 ml sont collectées soit après percolation sur colonne, soit par filtration après broyage. Les extraits sont ensuite analysés par spectrophotométrie (Acta C III, BECKMAN), selon un protocole détaillé par ailleurs (MONTIES, 1975*a*).

Les polyphénols présents dans les différents extraits ont été caractérisés tout d'abord de façon globale par la forme de leur spectre d'absorption. Il est bien établi que les polyphénols qui ne contiennent pas de noyaux phénoliques conjugués (tels les flavanoïdes et les tanins : fig. 1), ne présentent pas, en milieu alcoolique neutre, d'intenses pics d'absorption au-delà de 300 nm. Les polyphénols conjugués (tels les flavonoïdes, coumestanes ou dérivés d'acides hydroxycinnamiques : l'acide chlorogénique en particulier : fig. 1) présentent, au contraire d'intenses pics d'absorption entre 300 et 350 nm. Les raisons théoriques de ces faits ont été discutées par ailleurs (MONTIES, 1966*b*; SWAIN, 1976). Nous avons donc recherché

et caractérisé des polyphénols conjugués dans les extraits au moyen de leur absorption caractéristique entre 300 et 350 nm.

Après concentration sous vide et reprise dans 2 ml, une aliquote d'au maximum 20 µl est fractionnée par chromatographie sur couche de cellulose MN 300 (épaisseur 0,75 mm) dans trois solvants : A = acide acétique — eau (15-85), B = acide acétique — eau (50-50) et C = acide acétique — HCl conc. — eau (60-6-30). Les coumestanes et isoflavones sont identifiées sur couche mixte polyamide MN + cellulose MN 300 (25 + 5) à l'aide du solvant : éther de pétrole + benzène + méthyléthylcétone + méthanol + acide acétique (30 + 30 + 20 + 20 + 2, volumes), d'après SACHSE (1971). Le dosage du coumestrol est fait par fluorimétrie sur couche mince selon le protocole de MONTIES *et al.* (1976).

Les flavones sont révélées à l'aide du réactif de NEU (1958), acide diphénylborique-β-aminoéthylester (FLUKA ou SIGMA), pulvérisé en solution à 5 p. 100 dans le méthanol. Ce même réactif permet de détecter par fluorescence bleue, sous proche ultraviolet (360 nm), les acides galliques et ellagiques. Ces deux acides sont aussi révélés par IO_3K à saturation dans l'eau (HASLAM, 1966). Les catéchines et tanins condensés sont identifiés par réaction à la vanilline à 1 p. 100 dans HCl concentré.

Les séparations analytiques des polyphénols par électrophorèse haute tension sur couche mince sont pratiquées dans une cellule « CAMAG selon PASTUSKA » d'après la technique de WALKER et THOMSON (1969). Les séparations sont faites sur couche de 0,75 mm de cellulose MN 300 imprégnée de tampon Borax (19 g/l). Les quantités totales de polyphénols déposées sont de l'ordre de 1 $\mu g.cm^{-1}$. La séparation est faite pendant 30 à 45 min sous une tension de 1 000 volts; dans ces conditions l'intensité ne dépasse pas 25 mA, la température est maintenue voisine de 10 °C par la circulation d'un liquide réfrigérant.

L'isomérisation sous ultraviolet proche des acides chlorogéniques est faite par exposition des taches déposées sur la couche de cellulose avant chromatographie. L'irradiation dure 1 h avec une intensité de 20 $\mu W.cm^{-2}$ dans le proche ultraviolet (tube Général Electric GE-BLB F8 T5, filtré par écran Schott UG 1). La séparation des isomètres est faite immédiatement après et à l'obscurité.

Le dosage de l'acide chlorogénique selon le protocole de HOEPFNER (1932) est fait de la façon suivante : à 1 ml de la solution éthanolique à doser on ajoute 4 ml d'un mélange, volume à volume, d'acide acétique à 5 p. 100 et de nitrite de sodium à 0,5 p. 100. Après 5 min à température ambiante, on ajoute, tout en agitant, 1 ml de soude 10 N. La lecture spectrophotométrique est faite 15 min plus tard. Dans la modification du dosage de HOEPFNER, selon POMENTA et BURNS (1971), ne figure plus l'addition de soude; le dosage spectrophotométrique est fait cependant à 520 nm.

Le coumestrol et les quatre isoflavones de la luzerne : daïdzeine, formonétine, biochanine A et genestéine que l'on a utilisés pour les identifications par cochromatographie nous ont été donnés par le Dr E. M. BICKOFF qui les a isolés de luzernes (BICKOFF *et al.*, 1969). Les autres composés de référence (acides ellagique, gallique, chlorogénique et catéchine), produits Fluka, n'ont pas été repurifiés avant usage.

B. — *Analyse des polyphénols non extraits à l'aide de solvants*

Les préparations protéiques traitées par les solvants lors des extractions par broyage ou sous reflux, laissent un résidu protéique insoluble qui est récupéré sur verre fritté n° 3 et séché par lavages au méthanol, puis à l'éther éthylique.

Ce résidu, insoluble dans les solvants usuels, est solubilisable par le bromure d'acétyle dans l'acide acétique, puis dilution par l'eau selon un protocole dérivé de ceux proposés par KARER et WIDMER (1921) pour dissoudre les bois et adapté par JOHNSON *et al.* (1961) pour le dosage des lignines.

On place environ exactement 100 mg de résidu insoluble de protéines dans un tube pyrex de 20 ml (16 × 160 mm) bouché de façon lâche par un bouchon casquette en verre. Tout en agitant, au moyen d'un vibreur, on verse 10 ml du réactif : CH_3CO Br à 25 p. 100 dans l'acide acétique glacial puis on le plonge dans un bain-marie à 70 ± 1 °C. Pendant les 45 min. de réaction, le mélange est régulièrement remis en suspension à l'aide du vibreur. Le mélange, refroidi dans un bac à glace pendant une dizaine de minutes est ensuite dilué par 5 ml d'eau. Le tube est à nouveau plongé dans le bain-marie et agité régulièrement pendant 30 min, jusqu'à dissolution complète. Le mélange refroidi est ensuite transféré dans une fiole jaugée de 100 ou 250 ml contenant 4,5 ml de NaOH 2N et 50 ml d'acide acétique. A ce mélange, on ajoute 10 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine à 3,5 p. 100 dans l'eau. On ajuste enfin au trait de jauge par la quantité suffisante d'acide acétique.

Le dosage spectrophotométrique dans l'ultraviolet et le visible, jusqu'à 250 nm, est fait après un stockage minimum de 3 h à température ambiante et à l'obscurité.

La caractérisation des polyphénols solubilisés par traitement au CH_3CO Br des résidus insolubles est faite après extraction du mélange réactionnel neutralisé. Après dissolution complète, le mélange refroidi est dilué à 50 ml par de l'eau. Il est alors placé dans un bac à glace et lentement neutralisé à pH voisin de 7,0 (7,0 ± 0,3) par addition de soude concentrée. Éventuellement, une partie aliquote de la suspension est clarifiée par centrifugation (10 000 g — 10 mn), puis caractérisée comme précédemment par spectrophotométrie. Le restant, extrait par 3 volumes d'acétate d'éthyle, est analysé de la même façon que les autres extraits à l'aide de solvants.

Résultats

Nous avons caractérisé successivement les polyphénols, extractibles à l'aide de solvants, puis les polyphénols non extractibles présents dans les résidus insolubles.

A. — *Polyphénols extractibles par les solvants*

Ces polyphénols ont été identifiés dans un premier temps de façon globale par spectrophotométrie et chromatographie sur couche mince. On a recherché ensuite spécifiquement la présence de tanins condensés, de tanins hydrolysables et enfin d'acide chlorogénique.

A.1. — *Caractérisation globale des polyphénols solubles*

Sur la figure 2 sont présentés les spectres des extraits correspondant à l'isolat P_3. Une première extraction, faite par le mélange pentane-méthanol, a permis d'extraire plus de 90 p. 100 des pigments liposolubles. On constate cependant dans

les extraits M et A de faibles pics d'absorption situés au-delà de 350 nm, dus à des traces de pigments liposolubles, résiduels. Lors des extractions successives par fractions de 50 ml, nous avons vérifié, dans tous les cas, que le spectre de la quatrième aliquote était optiquement vide. On constate sur la figure que les spectres des extraits par l'éther éthylique (E), le méthanol (M) et l'eau (A) présentent une intense absorption entre 320 et 335 nm. Cette absorption est accompagnée dans tous les cas d'un pic d'intensité voisine centré vers 260 nm.

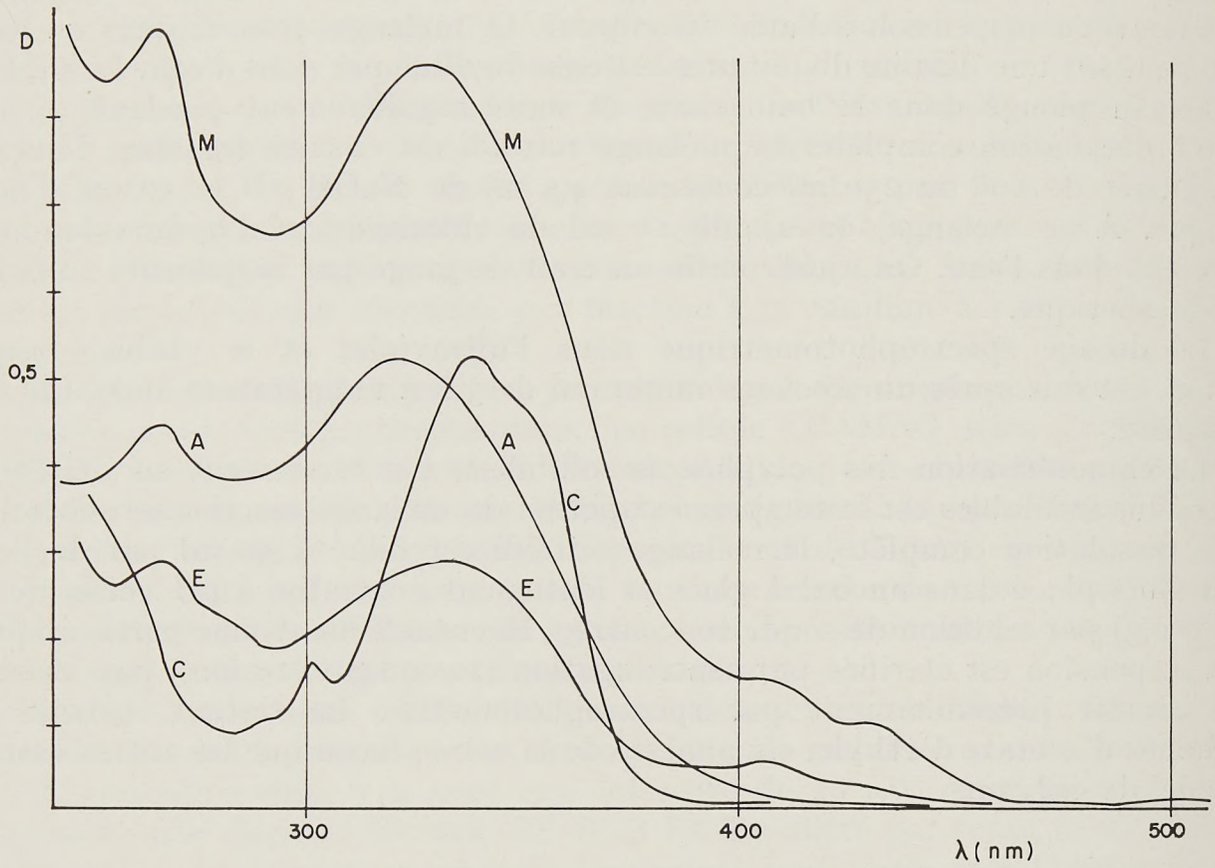


FIG. 2. — *Spectre d'absorption des extraits de la préparation protéique P_3 obtenus par l'éther éthylique (E) puis le méthanol (M) et enfin l'eau (A).*

Extraction par 4 broyages successifs de 1 g de protéine sèche dans 50 ml de chaque solvant, spectre des extraits réunis (200 ml) non dilués sauf pour E dilué au 1/2. C : spectre dans le méthanol du coumestrol : 3,9-dihydroxycoumestane (fig. 1).

Ce premier ensemble de résultats permet de conclure que l'on peut extraire, à l'aide de solvants et à partir de l'isolat P_3, des polyphénols conjugués. Il convient de remarquer aussi que les trois spectres E, M et A de la figure 2 ont des formes très voisines. Il est possible de caractériser ces spectres par la hauteur relative de ces deux maximums.

Cette seconde observation nous a conduit à comparer, selon ce critère, les spectres d'absorption des extraits obtenus par élution progressive sur colonne de 8 préparations de protéines de luzerne. Les résultats de cette comparaison, limitée aux extraits M et A, sont présentés dans le tableau 1.

Il est frappant de constater sur ce tableau que la similitude observée dans la figure 2 se retrouve, sans exceptions, dans les extraits de tous les échantillons analysés.

Compte tenu des différences d'origine et d'isolement de ces 8 préparations de protéines, une telle ressemblance ne saurait être fortuite. Cette ressemblance

conduit donc à supposer que les extraits de protéines contiennent tous des polyphénols conjugués de structure voisine. Compte tenu de l'allure uniforme des spectres de ces extraits, qui tous possèdent, au voisinage de 270 et de 325 nm, deux maximums de hauteur voisine caractéristiques des flavonoïdes (MABRY *et al.*, 1970), on est en droit de supposer que tous ces extraits contiennent principalement des dérivés de flavones. En effet, s'il n'en était pas ainsi, la présence dans

TABLEAU I

Caractéristiques spectrales et teneur équivalente en flavone des extraits de protéines de luzerne par le méthanol (extrait Me) *puis l'eau* (extrait Aq)

	Position (1) et hauteur relative (2) des maximums		Teneur équivalente en flavone (3)	
	Extrait Me	Extrait Aq	Total (Me + Aq)	Relative (Me/Aq)
L_1. . . .	268, 321 (0,91)	268, 320 (0,91)	1,1	1,20
L_2. . . .	269, 320 (0,52)	268, 322 (1,09)	2,4	0,04
L_3. . . .	268, 320 (0,60)	268, 324 (1,00)	2,2	0,02
L_4. . . .	268, 320 (0,61)	268, 324 (1,00)	2,4	0,03
P_1. . . .	268, 323 (0,81)	268, 324 (1,12)	2,0	0,50
P_2. . . .	268, 329 (0,72)	268, 325 (1,13)	1,2	0,25
P_3. . . .	268, 337 (1,00)	268, 324 (1,17)	0,7	0,59
P_4. . . .	268, 344 (1,35)	268, 326 (1,17)	2,4	5,00

(1) Longueur d'onde des deux maximums entre 250 et 500 nm.
(2) Hauteur du maximum de plus grande longueur d'onde par rapport au second : entre parenthèse,
(3) Calculée sur la base PM = 300 et ε = 20 000, exprimée en p. 100 du produit sec.

ces extraits de quantités importantes de flavanoïdes (absorbant principalement vers 280 nm) ou de coumestanes (absorbant principalement vers 330 nm, comme le coumestrol présenté fig. 2) modifierait nécessairement le rapport de la hauteur des pics à 270 et 325 nm.

A.2. — *Identification des polyphénols solubles par chromatographie*

La présence de flavones dans les extraits méthanoliques et aqueux a été confirmée par séparation et identification sur couche mince. L'identification des autres polyphénols : tanins galliques, ellagiques, catéchiques et leurs monomères, coumestanes, isoflavones et acide chlorogénique a été faite simultanément grâce aux réactions colorées spécifiques et par cochromatographie avec des composés de références (tabl. 2).

TABLEAU 2

Comportement chromatographique et révélations sur couche de cellulose des polyphénols monomères

Composition des solvants et des révélateurs : voir matériel et méthodes; couleurs : bleu (*b*), violet (*vi*), vert (*vt*), jaune (*j*), orangé (*or*), rouge (*r*), brun (*br*), clair (*c*), incolore (-).

	100 × R_f dans solvant			Couleur après révélation par à			
	A	B	C	R. NEU et exp. UV fluor.	R. NEU et exp. UV vis.	IO_3K	Vanilline
Ac. chlorogénique *trans* . . .	65	89	81	*b vt*	—	—	—
Catéchine	52	74	68	—	—	—	*r*
Rutine	49	83	79	*j*	*j*	—	—
Ac. gallique.	48	78	65	*b vi*	—	*br*	—
Ac. ellagique	6	31	36	*b c*	—	*br*	—
Coumestrol	4	51	60	*vi b*	—	—	—
Quercétine	0	39	37	*j or*	*or*	—	—
Kaempférol	0	52	50	*j vt*	*j*	—	—
Apigénine.	0	70	66	*j*	*r br*	—	—

Dans un premier temps, les polyphénols ont été extraits, selon un protocole voisin de celui utilisé par MILIC (1972), pour identifier les tanins catéchiques et galliques des feuilles de luzerne. Seuls les 4 échantillons P_1 à P_4 ont été ainsi analysés. Dans ces 4 extraits, nous avons constaté grâce aux séquences de révélation classique sous lumière ultraviolette (SMITH, 1960) et aux réactions colorées du tableau 2 :

1. la présence des flavonosides, de coumestrol ainsi que de composés à fluorescences bleues et violettes semblables à celles des dérivés des acides hydroxycinnamiques ou des coumestanes;

2. l'absence de quantités détectables de tanins catéchiques et galliques ainsi que de leurs monomères;

3. la présence possible, mais en tout cas à l'état de traces, d'acide éllagique.

Les flavonosides sont mal résolus par chromatographie lorsqu'on cherche à mettre en évidence l'ensemble des polyphénols extraits par l'acétate d'éthyle : ils sont relativement trop concentrés. Les meilleures séparations sont obtenues grâce au solvant A : les flavonosides forment alors une traînée de R_f compris entre 0,15 et 0,65 dans laquelle se distinguent au moins quatre taches. Après révélation par le réactif de NEU et exposition prolongée sous ultraviolet proche, ces traînées jaunes prennent une coloration brun-rougeâtre caractéristique des flavones de type apigénine ou 4'-OH-flavones (NEU, 1958) et de leurs dérivés

(MONTIES *et al.*, 1976). Après hydrolyse acide de ces extraits, extraction des aglycones par l'éther éthylique selon le protocole de MONTIES (1975*a*), puis séparation sur cellulose avec le solvant C, on constate la présence d'au moins trois taches de flavones de R_f compris entre 0,70 et 0,90 dont une, présente dans tous les extraits et de R_f 0,70, pourrait être la tricine. Ces résultats permettent de conclure à la présence de o-glycosides de flavones dans les feuilles de luzerne; cette conclusion concorde avec les données de BICKOFF *et al.* (1964, 1972) qui rapportent la présence d'au moins trois flavones, dont la tricine, dans les extraits de feuilles de luzerne.

La présence dans ces quatre extraits de quantités relativement importantes de flavonosides par rapport à tous les autres polyphénols a pu être confirmée par spectrophotométrie. Le spectre d'absorption des extraits par l'acétate d'éthyle des isolats P_3 et P_4 présente en effet, comme ceux des extraits méthanoliques et aqueux (tabl. 1), deux maximums de hauteur sensiblement égales. Ce résultat est bien compatible avec la présence d'un excès relatif de flavones.

Pour confirmer cette hypothèse nous avons appliqué à l'extrait P_4, repris dans le méthanol, la séquence de réactions qui permet de caractériser par spectroscopie les flavonosides au moyen des déplacements de leurs pics d'absorption. Le protocole et les résultats de tels essais ont été décrits par ailleurs dans le cas des C-glycosylflavones du Melon (MONTIES *et al.*, 1976). Les résultats, obtenus dans le cas de O-glycosylflavones de Luzerne sont présentés, de la même façon,

TABLEAU 3

Caractéristiques spectrales de l'extrait par l'acétate d'éthyle de la protéine P_4 en solution méthanolique

Solvant	Position (1) et hauteur relative (2) des maximums
Seul	268 (74), 346 (100)
+ Na O CH_3	262 (100), 274 (~), 325 (~), 410 (135)
+ $AlCl_3$	274 (72), 300 (42), 360 (~), 388 (88)
+ ($AlCl_3$ + HCl)	276 (69), 300 (45), 356 (76), 382 (73)
+ Na O CO CH_3	268 (73), 348 (90), 410 (~)
+ Na O CO CH_3 et $B(OH)_3$.	264 (96), 273 (~), 319 (~), 408 (105)

(1) Longueur d'onde en nm;
(2) Entre parenthèse : pourcentage de la hauteur maximum en milieu neutre ou épaulement (~).

dans le tableau 3. On constate que les déplacements observés ne diffèrent pas de façon significative de ceux rapportés avec des flavones pures (MABRY *et al.*, 1970; MONTIES *et al.*, 1976). Au total il paraît donc possible de conclure, que les extraits de protéines de Luzerne contiennent principalement des flavonosides.

Dans tous les cas, l'analyse chromatographique des extraits obtenus par élution progressive sur colonne a confirmé cette conclusion. Les extraits méthanoliques et aqueux du tableau 1 ont surtout été pris en considération; les quantités

présentes dans les extraits par l'éther éthylique étant beaucoup plus faibles, variables et réduites à l'état de traces dans les quatre échantillons de la série L. En conséquence, nous avons exprimé les teneurs en polyphénols sous forme d'équivalent en flavone sur la base de leur maximum d'absorption de plus grande longueur d'onde (tabl. 1). Il est surprenant de constater la faible amplitude de variation de ces teneurs. Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus d'autres concentrats lors des essais préliminaires réalisés pendant la campagne 1976 (résultats non publiés).

A.3. — *Présence de coumestanes*

Au cours de l'analyse chromatographique de tous ces extraits, nous avons constaté invariablement la présence de coumestrol qui est bien séparé grâce au solvant B; il est facile à révéler grâce à son intense fluorescence (tabl. 2). Ces résultats confirment donc la présence systématique de coumestrol dans les concentrats et les isolats protéiques de luzerne, présence rapportée pour la première fois semble-t-il par KNUCKLES *et al.*, en 1976; il a été possible de préciser ces conclusions par extraction progressive sur colonne. On a analysé pour cela l'isolat P_3. On a recherché par cochromatographie la présence de coumestrol dans les extraits successifs par l'éther éthylique, le méthanol et l'eau. On a constaté dans les trois extraits la présence de coumestrol que l'on a dosé par fluorimétrie sur couche de cellulose. On a trouvé respectivement 9, 12 et 7 µg de coumestrol par gramme d'isolat P_3 sec dans chacun des extraits éther-éthylique, méthanol et eau. Dans cette même série d'analyse les teneurs équivalentes en flavones, calculées selon les données du tableau 1, étaient respectivement de 0,9; 2,4 et 3,2 mg.

Ce second ensemble de résultats permet de dégager les conclusions suivantes. D'une part, il existe du coumestrol dans les préparations protéiques de luzerne, et ce coumestrol donne lieu à un phénomène de compartimentation tel qu'il a été défini par l'un d'entre nous en 1975 (MONTIES, 1975*a*). Ce dernier résultat confirme donc la généralité du phénomène de compartimentation (MONTIES, 1975*b*).

D'autre part, la teneur totale en coumestrol de l'isolat P_3 est relativement élevée et nettement supérieure à celle rapportée par KNUCKLESS *et al.* (1976). Une telle différence semble pouvoir être expliquée par la grande variabilité des teneurs en coumestrol observée en fonction des conditions de culture (BICKOFF *et al.*, 1967) et des variétés (POLIDORI *et al.*, 1974) dans les parties aériennes de luzerne.

Afin de préciser ces observations, nous avons comparé la composition des éluats des préparations L_1, L_2 et P_1 à P_4 obtenus sur colonne par l'éther éthylique. Après concentration, les polyphénols de ces extraits sont bien séparés sur couche de polyamide et de cellulose. Lors de ces comparaisons, nous n'avons observé de quantités mesurables de coumestrol que dans les échantillons de la série P, seules des traces étaient détectées dans la série L. L'intensité relative de fluorescence des taches allant en croissant dans l'ordre P_1 à P_4, nous avons analysé plus en détail l'extrait de P_4. Par séparation sur polyamide, nous avons observé la présence de coumestrol et d'au moins trois taches nettement résolues de flavones (R_f = 0,23; 0,33 et 0,53 respectivement). Dans ces conditions nous n'avons détecté ni de formonétine (R_f = 0,80), ni de daidzéine (R_f = 0,49), ni de biochanine A (R_f = 0,85), mais seulement des traces de génistéine (R_f = 0,48) masquée en partie par la flavone de R_f = 0,53 présente en quantité maximale dans tous les extraits. Les séparations sur cellulose avec le solvant C (tabl. 2) ont permis de préciser ces observations. Il a été possible, dans ces conditions, de mettre en évidence quatre

taches, ayant pour R_f = 0,24; 0,31; 0,35 et 0,43, qui sont identifiables d'après leurs réactions colorées à des coumestanes, ainsi que trois taches, ayant pour R_f = 0,26; 0,58 et 0,65, identifiables à des flavones. Après séparation sur cellulose, et pas plus que sur polyamide, nous n'avons pu détecter de quantités importantes d'isoflavones.

Ainsi, au total, l'ensemble de ces résultats permet de conclure que les extraits par l'éther des préparations protéiques de luzerne contiennent des aglycones de flavones et du coumestrol accompagné, très vraisemblablement, de coumestanes. Un tel résultat ne saurait surprendre puisque plusieurs composés de ce type ont déjà été rapportés dans les extraits de parties aériennes de luzerne par BICKOFF *et al.* (1969) et que tous sont particulièrement solubles dans l'éther éthylique. Il convient de remarquer cependant que, à cause du phénomène de compartimentation, aucune des extractions de coumestrol, et semble-t-il aussi de coumestane, n'est complète dans ce solvant.

Un second groupe de conclusions concernant la structure des aglycones de flavones peut être tiré quand on tient compte des relations qui existent entre leur mode de substitution et leur R_M dans le solvant C qui a été adapté, dans ce but, par l'un d'entre nous (MONTIES, 1975*a*). Les valeurs des R_f et des R_M, calculées d'après BATE-SMITH et WESTALL (1950) dans le solvant C pour sept flavonoïdes de référence et les trois flavones de luzerne, sont regroupées dans le tableau 4. Confirmant nos précédents résultats, on constate sur ce tableau que la méthoxylation des isoflavones, en 3′, ou l'hydroxylation des isoflavones ou des flavones, en 5, 3′ et 4′ respectivement font varier le R_M régulièrement. La comparaison des

TABLEAU 4

Relations entre comportement chromatographique sur cellulose (solvant : C) et la structure des flavonoïdes : identification préliminaire des flavones de luzerne

(Positions des substituants sur les cycles des flavonoïdes conformes au numéro de la figure 1)

	Substituants	R_f	R_M	ΔR_M
Isoflavones :				
B = Biochanine A .	3′OCH_3 — 5,7 OH	0,90	— 0,95	B — G = 0,26
G = Genistéine . .	3′, 5, 7 — OH	0,83	— 0,69	F — D = 0,25
F = Formonétine .	3′OCH_3 — 7 OH	0,91	— 1,00	B — F = — 0,05
D = Daïdzéine . . .	3′, 7 — OH	0,85	— 0,75	G — D = — 0,06
Flavones :				
A = Apigénine . . .	3′, 5, 7 — OH	0,66	— 0,29	A — K = — 0,28
K = Kaempférol . .	3, 3′, 5, 7 — OH	0,50	0,00	K — Q = — 0,23
Q = Quercétine . .	3, 3′, 4′, 5, 7 — OH	0,37	0,23	
Flavones de Luzerne :				
F_1	(3′, 4′, 7 — OH) ?	0,65	— 0,27	A — F_1 = 0,02
F_2 (Tricine ?) . . .	(3′, 5, 7 — OH — 4′, 5′ — OCH_3) ?	0,58	— 0,14	F_1 — F_2 = — 0,14
F_3	(hexasubstituée) ?	0,24	0,50	Q — F_3 = — 0,27

R_M de l'apigénine à ceux des flavones F_1 et F_2 conduit à supposer que F_1 qui a même R_M que l'apigénine possède 3 hydroxyles : la flavone F_1 serait donc la 3′, 4′, 7 trihydroxyflavone déjà rapportée par BICKOFF *et al.* (1972). La flavone F_2, dont le R_M est intermédiaire entre celui de l'apigénine et du kaempférol, pourrait donc être la tricine (3′, 5, 7-trihydroxy-4′, 5-méthoxyflavone) identifiée par BICKOFF *et al.* (1964). Cette hypothèse mérite d'être vérifiée parce que la flavone F_2 est quantitativement la plus importante dans tous les extraits. Enfin, la flavone F_3, dont le R_M est inférieur de 0,27 unités à celui de la quercétine, porterait un substituant de plus que cette dernière; F_3 pourrait donc être « la flavone hexa-substituée » et non encore identifiée, décrite par BRADNER et BRINK (1968).

A.4. — *Recherche des flavanoïdes et tanins*

Après avoir étudié les flavonoïdes des préparations protéiques de luzerne, nous avons recherché les tanins et leurs monomères au moyen des réactions colorées décrites dans le tableau 2. La recherche a été faite par chromatographie des extraits sous reflux des protéines de la série P par l'acétate d'éthyle. En aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence de tanins condensés, ni de catéchines au moyen de la réaction à la vanilline. De même, en aucun cas, nous n'avons pu constater la présence de tanins galliques et d'acide gallique monomère. Ces observations ont été confirmées après séparation dans l'acide acétique à 6 p. 100 recommandé par HASLAM (1966). En aucun cas, aussi bien avec le réactif à l'iodate de potassium qu'avec le réactif de NEU, plus sensible que le précédent, on a constaté la présence de tanins galliques. Seule la présence de traces d'acide ellagique semble possible. L'existence de cet acide a été constatée grâce au réactif de NEU et à l'iodate, après séparation sur couche de cellulose soit dans l'acide acétique à 6 p. 100 soit dans l'épiphase du mélange n-butanol + acide acétique + eau (14 + 1 + 5 volumes). Elle doit être confirmée.

A.5. — *Recherche d'acides chlorogéniques*

Pour achever ce bilan des polyphénols extractibles à l'aide de solvants, nous avons recherché la présence d'acide chlorogénique dans les préparations de la série P. De façon générale, la mise en évidence de l'acide chlorogénique a été rendue très difficile par la présence de nombreux composés à fluorescence bleue dont le comportement chromatographique était voisin, dans tous les solvants essayés, de celui de l'acide chlorogénique.

Les premières observations indiquant la présence possible d'acide chlorogénique dans les extraits de préparations de protéines ont été obtenues sur les extraits aqueux des préparations L_1, L_2 et P_1 à P_4. Ces extraits, préparés par élution progressive, puis concentrés et enfin repris dans le méthanol, ont été séparés sur cellulose dans de l'acide acétique aqueux à 5, 15 et 50 p. 100. Seules les séparations dans l'acide acétique à 15 p. 100 ont permis de révéler de faibles taches d'acide chlorogénique (isomère, trans $R_f = 0,65$, isomère cis, $R_f = 0,77$). Dans ces conditions la mise en évidence n'a pu être faite que par cochromatographie et isomérisation trans — cis après exposition sous ultraviolet proche. La confirmation de ces identifications par électrophorèse a été rendue impossible par la présence des flavonosides. Il a été cependant possible de confirmer ces premiers résultats par hydrolyse acide de l'acide chlorogénique. L'analyse a été faite sur l'extrait aqueux

de la préparation P_3; la cinétique d'hydrolyse par HCl 2N à 95 °C, en tube bouché, a été étudiée pendant 2 h selon un protocole décrit précédemment (MONTIES, 1975*a*). On a constaté, par chromatographie sur cellulose d'échantillons d'hydrolysat prélevés successivement; la disparition progressive de la tache d'acide chlorogénique *trans* et l'apparition de deux taches de même R_f que celles des acides caféiques isomères *trans* (R_f = 0,35) et *cis* (R_f = 0,42). L'ensemble de ces résultats permet donc de supposer qu'il existe de l'acide chlorogénique lié aux protéines de luzerne. Ces observations concordent donc avec les récentes conclusions de LAHIRY *et al.* (1977), mais elles ne les confirment que de façon qualitative. En effet, après chromatographie des extraits de protéines, nous n'avons pu mettre en évidence que de très faibles quantités d'acide chlorogénique mal séparées des polyphénols, ayant des propriétés voisines, alors que ces auteurs rapportent des teneurs variant environ de 1 à 10 mg/g de protéine (LAHIRY et SATTERLEE, 1975; LAHIRY *et al.*, 1977).

L'existence d'une telle différence nous a conduit à contrôler nos analyses en employant la méthode de dosage utilisée par ces auteurs. Nous avons donc dosé l'acide chlorogénique selon le protocole dérivé par POMENTA et BURNS (1971) de la classique méthode de HOEPFNER (1932). La modification du protocole de HOEPFNER consiste en l'abandon de la réaction d'alcalinisation après réaction avec le nitrite. Or, d'après HOEPFNER, cette réaction est nécessaire : elle rend spéci-

TABLEAU 5

Comparaison des réactions colorées et des spectres d'absorption des produits de réaction des polyphénols avec le nitrite de sodium selon les protocoles de HOEPFNER *(H) (1932) et de* POMENTA *et* BURNS *(P et B) (1971)*

Couleurs voir tableau 2, spectre d'absorption : $\lambda_{(max)}$ = longueur d'onde au maximum d'absorption $\Delta\lambda$ = largeur à mi-hauteur du côté des grandes longueurs d'onde du pic.
Détail des protocoles : voir matériel et méthodes; quantité de polyphénol = 150 µg/ml prise d'essai dans l'éthanol à 95 °C.

	Couleur selon protocole		Spectre d'absorption selon H	
	P et B	H	$\lambda_{(max)}$	$\Delta\lambda$
Ac. chlorogénique	*j*	*r*	520	70
Coumestrol	*i*	*j or*	420	30
Catéchine	*j*	*j*	450	90
Ac. éllagique	*r*	*j*	450	90
Ac. gallique	*or*	*j*	450	90
Quercétine	*j*	*j*	ev 400	20
Kaempférol	*j*	*j c*	ev 350	20
Rutine	*j*	*j r*	ev 400	20
Flavones de Luzerne (*) . .	*j*	*j*	ev 400	20

(*). Les flavones de Luzerne ont été préparées par hydrolyse acide (HCl 2N et extraction à l'éther éthylique d'un broyat de feuilles.

fique le dosage par formation d'une couleur rouge caractéristique de l'acide chlorogénique et ce, pour des teneurs de quelques dizaines de µg/ml de prise d'essai. Nous avons, dans un premier temps, vérifié la spécificité du protocole de HOEPFNER sur des polyphénols de référence; les résultats sont présentés dans le tableau 5. On constate sur ce tableau que seul le protocole de HOEPFNER (1932) permet de révéler spécifiquement l'acide chlorogénique au moyen d'un pic large, 520 nm, qui est bien distinct de celui des flavonoïdes. Le protocole modifié par POMENTA et BURNS est beaucoup moins spécifique : nous avons obtenu la même couleur uniformément, ocre-jaune, dans tous les cas, quels que soient les polyphénols. Compte tenu de ces résultats nous avons choisi le protocole de HOEPFNER pour rechercher la présence d'acide chlorogénique dans les extraits de protéines. Pour cela, nous avons analysé des extraits obtenus successivement par l'éther éthylique, le méthanol puis l'eau à partir de l'échantillon P_3. Les prises d'essai de 1 ml correspondaient à 10 mg de P_3. Après réaction nous n'avons observé ni couleur rouge, ni de pic d'absorption à 520 nm, mais seulement une couleur jaune correspondant à une chute monotone de l'absorption à partir d'un maximum centré vers 420 nm. D'après les données du tableau 5, ces résultats permettent de conclure qu'il n'existe que des traces d'acide chlorogénique dans les extraits de protéine P_3. Ces dernières observations confirment donc les conclusions tirées après étude chromatographique de ces extraits. L'existence d'une couleur uniformément jaune de ces extraits après réaction de HOEPFNER, confirme bien que les principaux polyphénols extractibles des protéines de luzerne, sont des flavonoïdes. De ces faits, on peut conclure que les autres préparations protéiques analysées L_1, L_2, P_1, P_2 et P_4, ne contiennent pas plus que des traces d'acide chlorogénique, puisque, comme celle de P_3, leur analyse chromatographique n'a révélé que des traces des deux formes isomères de cet acide.

Après avoir dressé ce premier bilan des polyphénols extractibles, nous avons étudié les polyphénols présents dans les résidus insolubles, obtenus après extraction, à l'aide de solvants des préparations protéiques.

B. — *Analyse des polyphénols présents dans les résidus d'extraction*

Les préparations protéiques P ainsi que les résidus insolubles que l'on obtient par extraction à l'aide de solvants, sont insolubles dans les tampons phosphate neutres et dilués, même en présence de détergents (Triton X 100 à 1 p. 1 000). Nous avons donc tenté de solubiliser ces résidus afin de mettre en évidence les polyphénols restés liés après extraction par les divers solvants. Nous avons ensuite caractérisé les polyphénols ainsi « solubilisés » soit directement par spectrophotométrie des solutions obtenues, soit indirectement après extraction liquide-liquide.

Comme les polyphénols sont de façon générale beaucoup plus stables dans les milieux acides qu'en milieux neutre ou alcalin, nous avons choisi le protocole utilisé par KARER et WIDMER (1921) pour solubiliser les matériaux cellulosiques comme le bois. Le réactif est un mélange de bromure d'acétyle dans l'acide acétique glacial : la réaction a donc lieu en milieu anhydre. Le mécanisme de réaction est complexe : il y aurait bromuration, dépolymérisation et surtout acétylation des produits solubilisés. Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole, décrit plus haut, qui permet de solubiliser les résidus d'extraction des protéines. La cellulose commerciale MN 300 peut être ainsi solubilisée et le spectre de la solution est optiquement vide jusqu'à 280 nm. Les protéines purifiées commerciales (albumine, caséine) sont aussi solubilisables, leur spectre d'absorption est vide

jusqu'à 300 nm environ. Entre 250 et 300 nm se situent les bandes d'absorption des phénols « solubilisés » : acides aminés aromatiques dans le cas des protéines ou résidus de lignines dans le cas de celluloses impures. C'est d'ailleurs sur ce principe qu'est fondée la méthode de dosage des lignines dans les bois proposée par JOHNSON *et al.* (1961) et c'est la raison pour laquelle nous avons modifié cette méthode pour tenter non seulement de solubiliser les résidus insolubles, mais aussi de caractériser puis doser les polyphénols.

B.1. — *Solubilisation des flavonoïdes présents dans les résidus insolubles*

Les résultats de ces essais sont présentés sur la figure 3. Dans un premier temps le protocole de dosage a été appliqué à des mélanges de quantités croissantes de rutine avec de la sérum albumine bovine. On constate, en comparant la forme des spectres d'absorption obtenus en présence et en absence de rutine que :

1. la présence de rutine se traduit par un pic d'absorption situé à 365 nm;

2. que la hauteur de ce pic est proportionnelle à la quantité de rutine ajoutée;

3. que la différence de l'absorption, vers 260 nm, entre les solutions contenant de la rutine et celle n'en contenant pas, varie parallèlement à l'absorption à 365 nm;

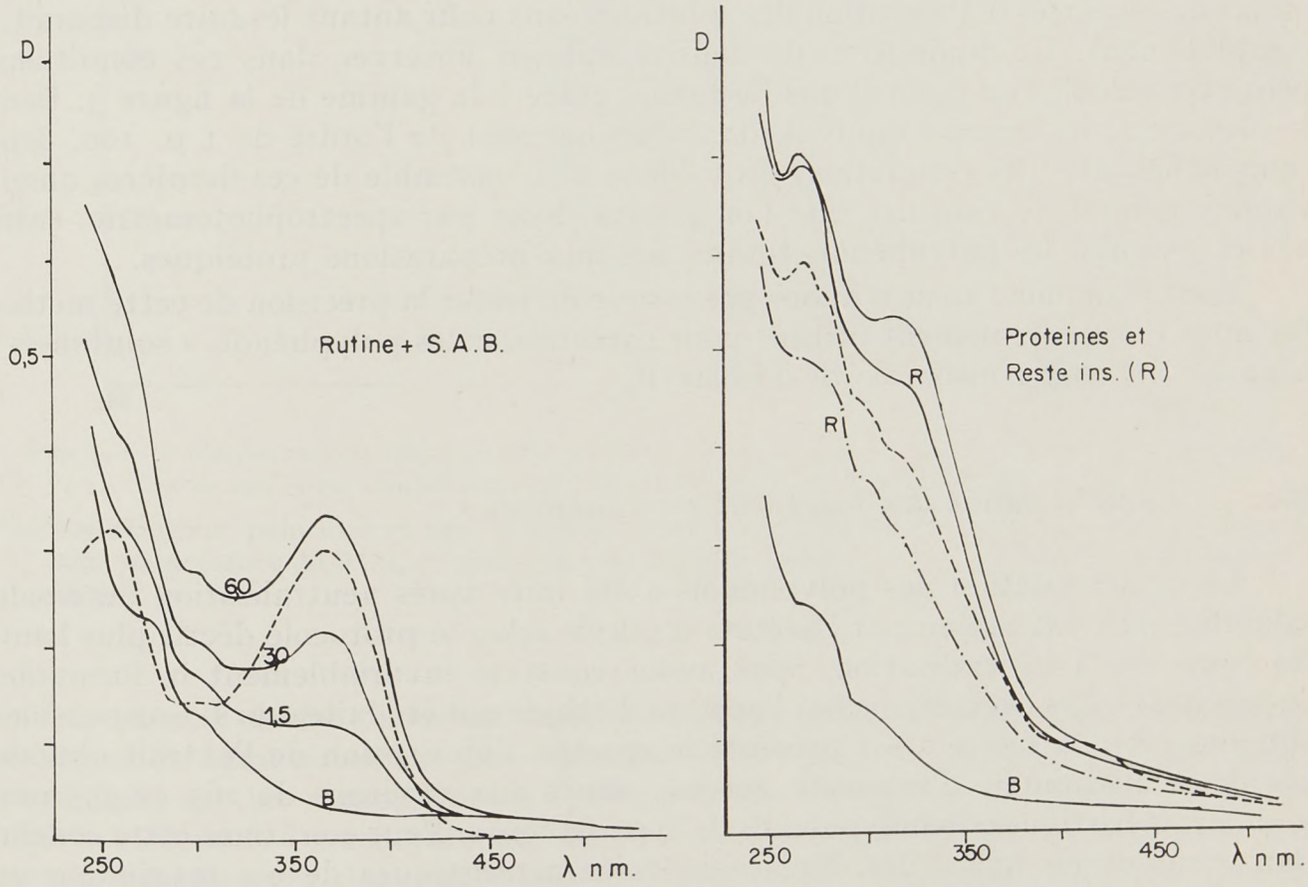


FIG. 3. — *Dosage des polyphénols après traitement de solubilisation dans le bromure d'acétyle acétique.*

A gauche : Expérience modèle sur de la sérum albumine bovine (B) contenant des quantités croissantes de rutine 1,5-3,0-6,0 mg pour 100 mg de prise d'essai. En pointillé : spectre de différence entre la courbe essai à 6 p. 100 de rutine (6,0) et le témoin protéine pure (B).

A droite : Spectre d'absorption de la solution obtenue après traitement de 100 mg des protéines P_3 (trait continu), L_1 (tiret) et de leur résidu insoluble (R).

4. que, enfin, le spectre de différence entre ces solutions présente l'aspect typique de celui des flavones avec deux pics d'égale hauteur à 260 et 365 nm.

Ces observations permettent de conclure que l'on peut utiliser le protocole proposé pour doser les flavonoïdes présents dans les préparations de protéines, grâce à leur absorption spécifique au-delà de 300 nm. Ces mêmes résultats permettent de constater que les noyaux flavones ne sont pas détruits par les réactions de solubilisation, puisque leur spectre se retrouve pratiquement inchangé après traitement. Cette dernière constatation nous a conduit à isoler par extraction à l'aide de solvants les polyphénols ainsi « solubilisés ».

En conséquence, nous avons appliqué ce protocole à l'analyse des résidus d'extraction des protéines. Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de polyphénols par analyse spectroscopique directe des résidus solubilisés. Sur la figure 3 sont présentés les résultats de deux analyses faites sur les résidus des préparations de protéine L_1 et P_3. Lors de ces essais on a comparé les spectres des résidus à ceux des préparations non extraites. On constate que tous les spectres obtenus, présentent entre 300 et 400 nm, des épaulements et même des pics d'absorption vers 320 nm et que, en aucun cas, l'absorption ne diminue entre 300 et 450 nm d'une façon monotone semblable à celle observée avec la sérum albumine. Compte tenu des résultats précédents, on est conduit à supposer que des flavonoïdes sont présents dans les résidus insolubles des préparations protéiques. La validité de cette hypothèse est confirmée par le fait que l'extraction par les solvants, qui élimine les polyphénols extractibles, a pour effet de réduire la hauteur des maximums des spectres d'absorption des solutions sans pour autant les faire disparaître complètement. La diminution de densité optique observée dans ces conditions, peut être calculée en équivalents de rutine grâce à la gamme de la figure 3. Dans les deux cas, les teneurs équivalentes obtenues sont de l'ordre de 1 p. 100, donc compatibles avec les estimations du tableau 2. L'ensemble de ces dernières observations permet de conclure que l'on pourra doser par spectrophotométrie, entre 300 et 350 nm, les polyphénols totaux liés aux préparations protéiques.

Pour le moment nous n'avons pas essayé de tester la précision de cette méthode; nous l'avons seulement utilisée pour caractériser les polyphénols « solubilisés » à partir du résidu insoluble de l'isolat P_3.

B.2. — *Caractérisation des polyphénols « solubilisés »*

La caractérisation des polyphénols a été faite après neutralisation du résidu solubilisé puis extraction par l'acétate d'éthyle selon le protocole décrit plus haut. Au cours de la neutralisation, nous avons constaté invariablement la formation de précipités. Les extractions par l'acétate d'éthyle ont été faites sur les suspensions obtenues. Sur la figure 5 est présenté le spectre d'absorption de l'extrait obtenu. Les deux maximums d'intensité voisine, situés aux environs de 265 et 335 nm, sont caractéristiques de polyphénols de type flavones. Pour confirmer cette conclusion, nous avons utilisé les déplacements caractéristiques de ces maximums en présence de chlorure d'aluminium et de méthylate de sodium (Mabry *et al.*, 1970). Ces déplacements sont présentés sur la figure 4; ils sont tout à fait comparables à ceux présentés dans le tableau 3. L'ensemble de ces différents résultats permet de conclure qu'il existe des flavonoïdes dans les résidus insolubles des préparations protéiques de luzerne.

Pour terminer ce travail, nous avons enfin vérifié que la méthode de solubili-

sation proposée, aurait permis de mettre en évidence des monomères de tanins (catéchine, acides galliques et ellagiques) s'ils avaient été présents dans les résidus insolubles. Pour ce faire nous avons appliqué le protocole de solubilisation à ces monomères. Nous les avons ensuite extrait par l'acétate d'éthyle après neutralisation du milieu réactionnel. Enfin, nous avons caractérisé les composés extraits par spectrophotométrie.

Sur la figure 4 est présenté le spectre de l'extrait obtenu par « solubilisation » de la catéchine. On constate que le produit obtenu présente encore un maximum unique, au voisinage de 280 nm, caractéristique des polyphénols non conjugués. On peut donc supposer que dans ces conditions le squelette aromatique des flavanoïdes n'est pas modifié. Comme cependant des réactions de substitution (halogé-

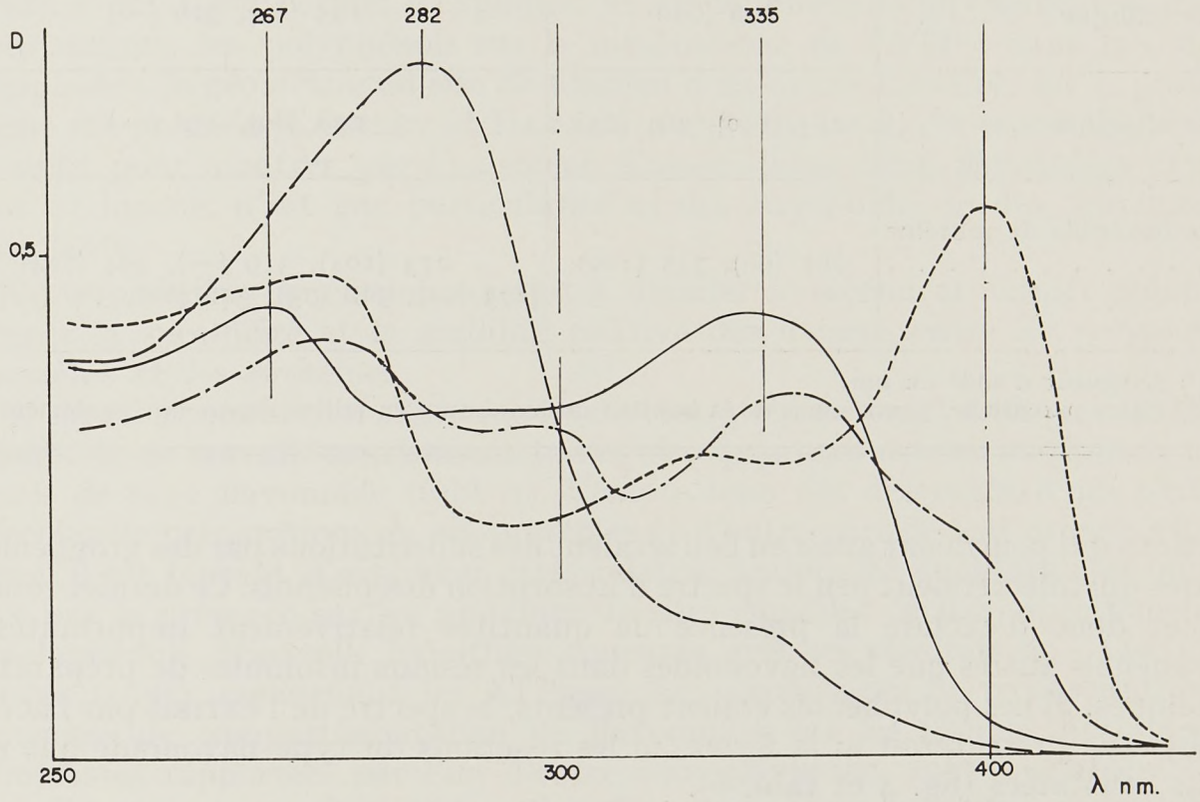


FIG. 4. — *Caractérisations spectrales des produits extractibles par l'acétate d'éthyle de protéine P_3 ou de catéchine solubilisées par traitement par le bromure d'acétyle acétique.*

Courbes continue, pointillée et tiret respectivement pour l'extrait de P_3 repris dans le méthanol seul, en présence de $AlCl_3$ et méthylate de sodium. Courbe en - - - - - pour l'extrait de catéchine.

nation ou acétylation) peuvent avoir lieu, nous avons appliqué aux extraits les réactions de caractérisation par déplacement des maximums. Les résultats de ces essais faits sur les monomères et l'extrait du résidu de l'isolat P_3 sont rapportés dans le tableau 6. On constate que dans tous les cas, le méthylate de sodium provoque un déplacement des maximums d'absorption. On peut donc conclure que les fonctions phénoliques ne sont pas bloquées par substitution. Dans le cas des flavonoïdes du résidu P_3, la formation de complexe avec $AlCl_3$, démontre que la fonction 4,5-cétoénolique, caractéristique des flavones, n'est pas substitué.

L'ensemble de ces résultats permet donc d'affirmer que le squelette carboné des polyphénols n'est pas modifié pendant les réactions de « solubilisation » des résidus. Puisque les fonctions phénoliques et cétoniques sont inchangées, les seules

TABLEAU 6

Caractéristiques spectrales des produits extractibles par l'acétate d'éthyle après traitement par le bromure d'acétyle acétique des résidus insoluble de protéine et de substances modèles

Traitement de	Position (1) et hauteur relative (2) des maximums dans le :	
	Méthanol pur	+ NaO CH_3 ou [+ $AlCl_3$] (*)
Catéchine	282 (100)	295 (95), 325 (~)
Acide gallique	276 (100)	295 (82), 326 (~)
Acide ellagique	253 (100), 364 (25)	278 (89), 350 (~)
Reste insoluble de protéine P_4	267 (98), 335 (100)	273 (104), 319 (~), 394 (124) [273 (91), 300 (73), 342 (82), 380 (~)] (*)

(1) Longueur d'onde en nm.
(2) Entre parenthèse, pourcentage de la hauteur du maximum en milieu neutre ou épaulement (~).

réactions qui pourraient avoir eu lieu seraient des substitutions par des groupements saturés qui affecteraient peu le spectre d'absorption des phénols. Ce dernier résultat permet donc d'exclure la présence de quantités relativement importantes de polyphénols autres que les flavonoïdes dans les résidus insolubles de préparations protéiques. Si ces polyphénols étaient présents, le spectre de l'extrait par l'acétate d'éthyle ne présenterait ni la forme, ni les réactions du type flavonoïde que nous avons constatées (fig. 4 et tabl. 6).

Discussion et conclusion

Les résultats obtenus peuvent être résumés de la façon suivante. Il existe dans les préparations protéiques extraites des parties aériennes de luzerne, des polyphénols monomères. Une partie de ces polyphénols est complètement extractible, par élution ou par broyage, dans des solvants. Une autre partie ne devient extractible à l'aide de solvants qu'après « solubilisation » de ces protéines par traitement au bromure d'acétyle acétique. Dans tous les cas, les polyphénols extractibles à l'aide de solvants, sont principalement des flavonosides. Des coumestanes et des traces d'acide chlorogénique sont également présents. Par contre, aucun tanin condensé ou hydrolysable, ni aucun monomère flavane ou gallique n'ont pu être mis en évidence dans ces extraits. Enfin, les polyphénols rendus extractibles après traitement au bromure d'acétyle sont aussi et principalement des flavonoïdes.

Pour conclure, nous discuterons seulement deux de ces résultats : la présence de flavonoïdes et l'absence de flavanoïdes.

Les polyphénols que nous avons extraits des préparations de protéine ne sont pas des polymères de type tanins, mais des monomères flavonoïdes (dérivés de flavones et de coumestanes). A notre connaissance, un tel résultat n'avait pas été encore rapporté. Il est pourtant peu surprenant : l'existence d'associations entre un autre polyphénol monomère, l'acide chlorogénique, et des protéines particulières ont déjà été rapportées (Amorin *et al.*, 1975; Pierpoint *et al.*, 1977). La formation d'associations spécifiques entre ce même acide et certaines protéines de faible poids moléculaire a été aussi décrite dans des extraits de graines de tournesol (Sabir *et al.*, 1975) et des feuilles de luzerne (Lahiry *et al.*, 1977). La formation d'associations analogues entre certaines flavones de structure définie et certaines protéines : ATPases mitochondriales (Lang et Racker, 1974) et chloroplatiques Deters *et al.*, 1975) permet d'expliquer les effets différents qu'exercent, à faibles concentrations, ces polyphénols sur le métabolisme de l'ATP : dans le cas des chloroplastes, la géométrie du site de fixation d'un de ces flavonols sur la protéine a même été précisée (Cantley et Hammes, 1975). Au total, cet ensemble d'exemples suffit pour montrer que l'existence d'associations entre flavonoïdes et protéines de luzerne n'est une particularité ni des flavonoïdes ni des protéines de cette plante.

Cette première conclusion conduit à discuter le second et dernier point qui concerne la spécificité et la stabilité relative des liaisons entre les polyphénols monomères et les protéines.

Il est remarquable, en effet, que les diverses préparations protéiques analysées au cours de ce travail, contiennent toutes des quantités totales voisines de polyphénols de type flavonoïde (tabl. 1). Compte tenu des diversités, d'une part des protocoles de préparations de ces protéines et d'autre part de leur origine géographique, il est tentant d'expliquer cette relative uniformité qualitative et quantitative par la présence sur les protéines de sites capables de fixer spécifiquement ces polyphénols. Une telle hypothèse concorde avec les résultats de Cantley et Hammes (1975), concernant les ATPases. Les expériences de reconstitution du phénomène de compartimentation de flavonoïdes sur les résidus insolubles de chloroplastes rapportées par l'un d'entre nous (Monties, 1975*a*) semblent aussi compatibles avec cette hypothèse. En effet, après avoir lyophilisé des solutions contenant des quantités différentes de flavonoïdes en présence de ces résidus de chloroplastes, nous avons constaté que, par extraction progressive à l'aide de méthanol puis d'eau, on extrait par l'eau des quantités de flavonoïdes sensiblement égales et qui ne dépendent pas des quantités initiales totales de flavonoïdes. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des résidus insolubles de feuilles. Nous avons proposé d'expliquer ces résultats par la présence dans les résidus insolubles de chloroplastes et de feuilles d'un nombre fini de sites de fixation des flavonoïdes. De même, l'uniformité qualitative et quantitative de l'équipement en polyphénols des protéines de luzerne peut être expliquée par un nombre fini de sites de fixation des flavonoïdes sur ces préparations.

On doit ajouter que l'hypothèse de l'existence de sites de fixation des flavonoïdes sur les protéines, permet de rendre compte du comportement de tanins de ces polyphénols non tanins. En effet, on explique généralement la stabilité remarquable des associations protéines-tanins, par la formation d'un nombre élevé de liaisons de faible énergie qui peuvent s'établir entre les sites correspondants de ces macromolécules. Par analogie avec les mécanismes de fixation des effecteurs enzymatiques sur les sites récepteurs des enzymes, on peut aussi supposer que la

fixation des polyphénols monomères, sur leurs sites récepteurs, se fait par combinaison de plusieurs interactions faibles. Pour cette raison, certains polyphénols monomères partageaient avec des polyphénols polymères, des propriétés de tanins; ils ne diffèreraient donc que par leur spécificité relative de fixation sur les protéines. On peut espérer que les deux méthodes d'extraction progressive, par des solvants d'une part, et de solubilisation conservative par le bromure d'acétyle d'autre part, devraient permettre de préciser par la suite ces hypothèses.

Il convient, avant de conclure, de discuter plus en détail le problème posé par la description de quantités non négligeables de tanins et d'acide chlorogénique dans certains cultivars de luzerne, composés que nous n'avons pu détecter, ou détecter seulement à l'état de traces, dans les extraits de protéines de luzerne, variété Europe. Lors d'analyses témoins, nous avons obtenu les mêmes résultats par analyse de feuilles de luzerne « Europe » et non pas de préparations protéiques : présence de traces d'acide chlorogénique et absence de tanins en quantité détectable. Or la présence de catéchines monomères et polymérisées a été rapportée en 1972 dans les tiges et feuilles de luzerne Panonia récoltée en Yougoslavie. En 1973, JONES *et al.* n'ont pu confirmer la présence de flavanoïdes dans des luzernes de variété non précisée, cultivées en Nouvelle-Zélande. Par la suite SARKAR *et al.* (1976) analysant des luzernes de variété Beaver cultivée au Canada, n'ont pu mettre en évidence des tanins catéchiques; ils ont confirmé cette conclusion en précisant la spécificité du test à la vanilline utilisé pour révéler les flavanoïdes, SARKAR et HOWARTH (1976). Utilisant cette réaction sur un très grand nombre de plants de luzerne de HOWARTH et GOPLEN n'ont pas pu constater la présence de flavanoïdes (HOWARTH, 1977, communication personnelle). L'ensemble de ces données conduit à supposer que seules certaines variétés de luzerne contiennent des quantités détectables de flavanols et de tanins condensés. L'absence de catéchines et de tanins condensés dans les extraits de feuilles et de protéines de la variété Europe analysée ici, refléterait donc la variabilité de l'équipement en flavanoïdes des différents cultivars de luzerne.

Il est tout aussi vraisemblable que les différences, discutées plus haut, entre les teneurs en acide chlorogénique des préparations protéines isolées par nous-mêmes et par LAHIRY *et al.* (1977), reflètent une variabilité de l'équipement en acides chlorogéniques des différents cultivars de luzerne. Très récemment, DAVIES, NOWBY et SYNGE (1977) n'ont pu détecter que de faibles quantités d'acide chlorogénique lié aux protéines de luzerne, variété Europe. Ce dernier résultat confirme donc nos observations.

Quoiqu'il en soit, il paraît difficile d'exclure l'existence dans les différents cultivars de luzerne de variations quantitatives de l'équipement polyphénolique. Des variations de ce type ont été déjà rapportées dans le cas des isoflavones et des coumestanes par BICKOFF *et al.* (1967). La généralité du phénomène de variabilité de l'équipement polyphénolique des cultivars a été précisée récemment (MONTIES *et al.*, 1976) : dans le cas des flavonoïdes de luzerne, ce même phénomène ne peut être exclu puisque la mise en évidence d'un composé donné dépend à la fois du seuil de détection analytique et des quantités présentes dans les extraits. On ne peut pas non plus exclure que la variabilité des teneurs en fibres ligno-cellulosiques rapportées dans des populations de luzerne par HEINRICHS et TROELSEN (1965) ne dépende de variations en lignine : autre composé polyphénolique (fig. 1).

En conclusion, compte tenu d'une part des propriétés « tanins » de certains polymères et monomères polyphénoliques, et d'autre part de la variabilité de l'équipement en polyphénols des cultivars de luzerne, on peut prévoir l'existence

de différences de composition en polyphénols des diverses préparations protéiques de luzerne. Cette dernière conclusion confirme donc l'intérêt qu'il y aurait à décrire « en termes chimiques et de façon quantitative les différents constituants » des préparations protéiques. L'intérêt d'un tel bilan a été très nettement souligné par SYNGE (1975) qui citait à ce propos VIRTANEN. Dans le domaine des polyphénols, un tel inventaire serait particulièrement utile parce que les « effets physiologiques » de ces substances varient non seulement avec leur degré de polymérisation mais aussi avec la forme de leur squelette carboné et même avec le mode de substitution de ce squelette.

C'est ainsi que dans la seule série des flavonoïdes présents dans les feuilles de luzerne et en fonction des variations de leur seul mode de substitution, on a rapporté des variations du pouvoir œstrogénique (BICKOFF *et al.*, 1969; SCHUTT, 1976) des activités antioxydantes et antihémolytiques (NAIM *et al.*, 1976) et des effets sur le métabolisme de base (STEIZIG et QUASIM, 1973). Compte tenu de la diversité de ces effets, un tel bilan devrait permettre d'améliorer rationnellement la qualité des isolats protéiques de luzerne.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciements

Les échantillons de coumestrol et d'isoflavanes utilisés comme référence nous ont été fournis par les Drs E. M. BICKOFF et K. KOHLER du *Western Reg. Res. Center*, U.S.D.A., Berkeley C.A., où ils ont été isolés et caractérisés. Les auteurs remercient aussi le Professeur R. L. M. SYNGE et le Dr HOWARTH pour la communication de leurs résultats avant publication.

Summary

Occurence of flavonoids (Flavones and Coumestanes) in Alfalfa (Medicago sativa *var. Europe*) *leaf proteins*

Flavonosides and coumestanes were extracted from " leaf protein " prepared from juice of aerial parts of alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe). A first fraction of these phenolics was completly extractable by organic solvents (fig. 2). In this case, the " compartmentization phenomenon " (MONTIES, 1975*a* et *b*) was again observed: the same phenolics were extracted by the different solvents used successively. A second fraction was only rendered soluble in organic solvents (fig. 4) after heating with acetylbromide in glacial and then hydrated acetic acid (fig. 3). This treatment allows a conservative solubilization of the phenols linked to the solvent extracted " insoluble residue " of proteins. Proteins were prepared by selective precipitation either by heating, either by organic solvent addition. Whatever may be these conditions of preparation their content, in relation to dry matter, were 10^{-3} for flavone and 10^{-6} for coumestanes. Total flavonosides were estimated by UV spectrophotometry after characterization by their absorption spectra (tabl. I) and their spectral shifts (tabl. 3 and 6) and by their R_f and their R_M (tabl. 4) after cellulose thin-layer chromatography. Occurence and compartmentization of coumestrol was also observed by cellulose TLC chromatography; only traces of chlorogenic acid were detected and neither tanins or flavanoids were observed in these conditions (tabl. 2).

The possible occurence of specific sites for adsorption of phenolics by alfalfa leaf proteins is discussed in relation to previous publications. In these extracts of whole leaves or of their proteins the occurence of only traces of chlorogenic acid and the absence condensed or hydrolysable tanins seems indicative of quantitative variation in polyphenolic compounds between alfalfa cultivar: the occurence of these compounds has been reported previously in other alfalfa varieties.

Références bibliographiques

AMORIN H. V., TEIXEIRA A. A., MELO M., CRUZ V. F., MALAVOLTA E., 1975. Chemistry of brazilian green coffee and the quality of the beverage. IV. — electrophoresis of protein on agar gel and its interaction with chlorogenic acids. *Turrialba*, **25**, 18-24.

BATE-SMITH E. C., WESTALL R. G., 1950. Chromatographic behaviour and chemical structure. I. — Some naturally occuring substance. *Bioch. Bioph. Acta*, **4**, 427-440.

BICKOFF E. M., LIVINGSTON A. L., BOOTH A. N., 1964. Tricin from alfalfa-isolation and physiological activity. *J. Pharm. Science*, **53**, 1411-1412.

BICKOFF E. M., LOPER G. M., HANSON C. H., GRAHAM J. H., WITT S. C., SPENCER R. R., 1967. Effect of common leafspot on coumestans and flavone in alfalfa. *Crop Sci.*, **7**, 259-261.

BICKOFF E. M., SPENCER R. R., WITT S. C., KNUCKLES B. E., 1969. Studies on the chemical and biological properties of coumestrol and related compounds. *USDA Tech. Bull.*, n° 1408 — U.S. Gov. Print. Off-pub. Washington.

BICKOFF E. M., KOHLER G. O., SMITH D., 1972. Chemical composition of herbage. Chap. 4, p. 269 in *Alfalfa Science and Technology*, HANSON C. H., Édit. Am. Soc. Agron. inc.

BRADNER N. R., BRINK V. C., 1968. A new flavonoid in alfalfa. *Can. J. Plant Science*, **48**, 97-99.

CANTLEY L. C., HAMMES G. G., 1976. Investigation of quercetin binding sites on chloroplasts coupling factor 1. *Biochem.*, **15**, 1-7.

CHEEKE P. R., MYER O., 1975. Protein digestibility and lysine availability in alfalfa meal and alfalfa protein concentrate. *Nutrit. Rep. Internat.*, **12**, 337-344.

DAVIES A. M. C., NEWBY V. K., SYNGE R. L. M., 1977. Bound quinic acid as a mesure of coupling of leaf and sunflower seed proteins with chlorogenic acid congeners: loss of availability of lysine. *J. Sci Food. Agric.*, **29**, 33-41.

DETERS D. W., RACKER E., NELSON N., NELSON H., 1975. Partial resolution of the enzymes catalysing the photophosphorylations. XV. — Approaches to the active site of coupling factor I. *J. Biol. Chem.*, **18**, 1495-1499.

EDWARDS R. H., MILLER R. E., de FREMERY D., KNUCKLESS B. E., BICKOFF E. M., KOHLER G. O., 1975. Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 620-626.

FAUCONNEAU G., 1976. Industries des protéines non classiques. *Cong. Int. Sciences Techn. au service des Pays en développement*, Paris, p. 81-103, UNESCO édit.

FREE B. L., SATTERLEE L. D., 1975. Biochemical properties of alfalfa protein concentrate. *J. Food Science*, **40**, 85-89.

HASLAM E., 1966. The hydrolysable Tannins. p. 95 in Chemistry of vegetable tannins, 179 p. Acad. Press.

HASLAM E., 1974. Polyphenol — proteins interaction. *Biochem. J.*, **139**, 285-288.

HEATHERBELL D. A., 1976. Haze and sediment formation in clarified apple juice and apple wine. *Food Tech. N. Zeeland*, **11**, 17 et 23.

HEINRICH D. H., TROELSEN J. E., 1965. Variability of chemical constituents in an alfalfa population. *Can. J. Plant Science*, **45**, 405-412.

HOEPFNER W., 1932. Zwei neue Reaktionen für Kaffeesaure und Chlorogensaure. *Chem. Zeitung.*, **100**, 991.

JONHSON D. B., MOORE W. E., ZANK C. E., 1961. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *T.A.P.P.I.*, **44**, 793-798.

JONES W. T., ANDERSON L. B., ROSS M. D., 1973. Bloat in cattle, detection of protein precipitants (flavolans) in legumes. *N. Z. J. Agric. Res.*, **16**, 441-446.

KARRER P., WIDMER F., 1921. Polysaccharide: XI. — Zur Kenntnis der Cellulose und des Lignins. *Helv. Chim. Acta*, **1921**, 700-702.

KNUCKLES B. E., de FREMERY D., KOHLER G. O., 1976. Coumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1177-1180.

LAHIRY N. L., SATTERLEE L. D., 1975. Release and estimation of chlorogenic acid in leaf protein concentrate. *J. Food Science*, **40**, 13-26.

LAHIRY N. L., SATTERLEE L. D., HSU H. W., WALLAGE G. W., 1977. Characterization of the chlorogenic acid binding fraction in leaf protein concentrates. *J. Food Science*, **42**, 83-85.

LANG D. R., RACKER E., 1974. Effects of quercetin and F_1 inhibitor on mitochondrial ATPase and energy linked reactions in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 180-186.

MABRY T. J., MARKHAM K. R., THOMAS M. B., 1970. The systematic identification of flavonoids. 354 p. Spinger edit.

Mc GUINNESS J. D., EASTMOND R., LAWS D. R. J., GARDNER R. J., 1975. The use of ^{14}C-labelled polyphenols to study haze formation in beer. *J. Inst. Brew.*, **81**, 287-292.

MILIC B. Lj., 1972. Lucerne tannins. I. — Content and composition during growth. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1151-1159.

MILIC B. Lj., STOJANOVIC S., VUCUREVIC N., 1972. Lucerne tannins. II. — Isolation of tannins from Lucerne, their nature and influence on the digestive enzymes *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1157-1162.

MONTIES B., 1966*a*. Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la Pomme. 1re partie p. 54. *Ann. Physiol. Vég.*, **8**, 49-73.

MONTIES B., 1966*b*. Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la Pomme. 2e partie. *Ann. Physiol. Vég.*, **8**, 101-135.

MONTIES B., 1971. Occurence of C-glycosylflavone in the leaves and the chloroplast of melon (*cucumis melo*). Proc. II Intern. Cong. Photosynthesis STRESA (Italy). Vol. II, 1681-1691. FORTI G., Édit., DE JUNK, The Hague Pub.

MONTIES B., 1975*a*. Étude de quelques relations entre polyphénols et photosynthèse. Thèse de Doctorat ès Sciences, n° 1410. Faculté des Sciences d'Orsay, I.N.R.A. Édit.

MONTIES B., 1975*b*. Compartimentation des polyphénols dans les feuilles des Angiospermes. Conv. Intern. Polifenoli, Ass. 1975 — Groupe. Polyphénols, GARGNANO/GARDA (Italy), 149-160, MANITTO P., édit. C.N.R. Pub.

MONTIES B., CHESNEAUX M. Th., HUTIN C., 1976. Caractérisation des cultivars à l'aide de différences quantitatives de teneurs en composés polyphénoliques : applications au Maïs et à l'Œillet. *Ann. Amélior. Plantes*, **26** (4), 495-516.

MONTIES B., BOUILLANT M. L., CHOPIN J., 1976. C-diholosylflavones dans les feuilles du Melon (*Cucumis melo*). *Phytochem.*, **15**, 1053-1056.

MYER R. O., CHEEKE P. R., 1975. Utilization of alfalfa meal and alfalfa protein concentrate by rats. *J. Anim. Sciences*, **40**, 500-508.

MYER R. O., CHEEKE P. R., HENNICK W. H., 1975. Utilization of alfalfa protein concentrate by swine. *J. Anim. Science*, **40**, 885-891.

NAIM M., GESTETNER B., BONDI A., BIRD Y., 1976. Antioxydative and anti-hemolytic activities of Soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1174-1177.

NEU R., 1958. Der Nachweiss der Hydroxyphenyl-benzo-γ-pyrone mit Diarylborsaüren in Gegenwart von Elektronendonatoren. *Naturwiss.*, **45**, 311.

PIERPOINT W. S., IRELAND R. J., CARPENTIER J. M., 1977. Modification of proteins during the oxydation of leaf phenols: reaction of Potato virus X with chlorogenoquinone. *Phytochemistry*, **16**, 29-34.

POLIDORI F., GALVANO G., LANZA A., SARRO F., 1974. Variazioni del contenuto in " cumestrolo " del forragio di Medica coltiva to nella Piana di Catania, in funzione dei tipi et dello stadio biologico. *Alimentazione Anim.*, **18**, 25-31.

POMENTA J. V., BURNS E. E., 1971. Factors affecting chlorogenic quinic and caffeic acid levels in sunflower kernels. *J. Food Science*, **36**, 490-492.

ROUELLE M., 1773. Sur les fécules ou parties vertes des plantes et sur la matière glutineuse ou végéto animale. *J. Med. Chir. Pharm.*, **45**, 59-67.

SABIR M. A., SOSULKI F. W., FINLAYSON A. J., 1974. Chlorogenic acid-protein interaction in sunflower. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 575-578.

SACHSE J., 1971. Die Dünnschichtchromatographische Trennung einiger Isoflavone neben Cumestrol. *J. Chromatog.*, **58**, 297-301.

SARKAR S. K., HOWARTH R. E., GOPLEN B. P., 1976. Condensed tanins in herbaceous legumes. *Crop. Science*, **16**, 543-546.

SARKAR S. K., HOWARTH R. E., 1976. Specificity of vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 317-320.

SCHUTT D. A., 1976. Effets des œstrogènes végétaux sur la reproduction animale. *Endeavour* (édition française), **35**, 110-113.

SMITH I., 1960. Chromatographie and electrophoretic techniques. Vol. I, Chap. 16 et 17. HEINEMANN MED. BOOK Ltd. Londres, 617 p.

STAHMANN M. A., 1968. The potential for protein production from green plants. *Econ. Bot.*, **22**, 73-79.

STEIZIG D. A., QUASIM S. A., 1973. Structural determination of two basal metabolic rate-stimulating flavones from grass silage. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 883-885.

SWAIN T., 1976. Nature and properties of flavonoids. p. 426 in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. I, 425-463. Seconde édition T. W. GOODWIN édit. Acad. Press.

SYNGE R. L. M., 1975. Interaction of polyphenols with proteins inplants and plants products. *Qual. Plant-Pl. Fds. hum. Nutr.*, **24**, 337-350.

WALKER J. R. L., THOMPSON J. E., 1969. Thin layer electrophoresis of phenolic compounds *Lab. pract.*, **18**, 629-631 et 653.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 655-679.

Identification et dosage des acides monomères à structure cyclique hydrogénés obtenus à partir d'une huile de lin thermopolymérisée et d'une huile de lin oxydée thermiquement

B. POTTEAU, P. DUBOIS et J. RIGAUD

avec la collaboration technique de Geneviève COMPOINT

Station de Recherches sur la Qualité des Aliments de l'Homme,
Station de Technologie des Produits Végétaux,
Centre de Recherches de Dijon, I.N.R.A.,
7, rue Sully, BV 1540, 21034 Dijon Cedex (France)

Résumé

Des huiles de lin ont été chauffées soit par thermopolymérisation à 275°C sous azote pendant 12 heures, soit par oxydation thermique à 200 °C à l'air pendant 100 heures. Les esters méthyliques de ces deux huiles ont été fractionnés à l'urée et hydrogénés, puis ils ont été séparés au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse couplé avec un spectromètre de masse. Neuf pics principaux ont été séparés et caractérisés. Cinq de ces pics ont pu être identifiés; ils correspondent aux isomères de configuration de dérivés monocycliques à structure cyclohexane α-disubstitués correspondant à la formule (1) :

(I) $H(CH_2)_n — C_6H_{10} — (CH_2)_{11-n}\ COO\ CH_3$, avec $n = 2, 3$ et 4.

Les composés pour lesquels $n = 3$ sont les plus abondants.

Par ailleurs, les spectres de masse obtenus à partir de deux autres pics majeurs et leur comportement chromatographique permettent de faire l'hypothèse qu'ils correspondent principalement à des dérivés monocycliques à structure cyclopentane α-disubstitués correspondant à la formule (II) :

(II) $H(CH_2)_n — C_5H_8 — (CH_2)_{12-n}\ COO\ CH_3$, avec $n = 3$ et 4

La présence des composés (I) et (II) a été mise en évidence dans les deux huiles chauffées.

A partir de l'huile de lin thermopolymérisée on a séparé un pic mineur qui pourrait correspondre à un dérivé bicyclique à structure hexahydroindane α-disubstituée de formule (III) :

(III) $H(CH_2)_2 — C_9H_{14} — (CH_2)_6\ COO\ CH_3$

Cependant, les spectres de masse obtenus ne correspondent pas dans tous les cas à des composés purifiés, ils suggèrent la présence de faibles quantités de composés de structure (I) avec des valeurs différentes de $n (n = 1$ et $n \geqslant 4)$.

L'identification par spectrométrie de masse des composés de formule (I) et (III) dans des huiles chauffées a déjà été effectuée par d'autres auteurs. Il n'en est pas de même en ce qui concerne les composés de formule (II).

Mots-clés : *Huiles de lin, Thermopolymérisation, Hydrogénation, Oxydation, Acides monomères cycliques, Chromatographie gazeuse, Spectrométrie de masse, Identification.*

Introduction

L'application de différents types de traitements thermiques à des corps gras peut conduire à des modifications d'ordre chimique diverses. Les travaux ayant cherché à séparer, identifier et doser les différents composés atypiques formés au cours du chauffage sont nombreux, ils ont fait l'objet de mises au point très documentées de FIRESTONE (1963), ARTMAN (1969), GUILLAUMIN (1969, 1971), FIGGE (1971), PERKINS (1976). Parmi les nombreux types de composés qui ont pu être caractérisés, les acides monomères à structure cyclique peuvent se former par cyclisation intramoléculaire d'une chaîne grasse insaturée, leur molécule contient un nombre égal d'atomes de carbone à celui des acides gras de départ. Le principal intérêt accordé aux acides monomères à structure cyclique provient du fait que leur utilisation digestive est élevée, et qu'administrés à fortes doses ils provoquent à bref délai la mort des animaux d'expérience (CRAMPTON *et al.*, 1953, 1956) (MATSUO, 1962), (MICHAEL, 1966*a*), (ARTMAN, 1969), (SAITO et KANEDA, 1976).

Au cours des 20 dernières années de nombreuses études ont été entreprises en vue de préciser la structure de ces acides monomères cycliques. Ces travaux ont montré qu'il s'agit principalement de dérivés 1-2 disubstitués de noyaux à 6 atomes de carbone : benzène (IA), cyclohexadiène (IIA), cyclohexène (IIIA) et cyclohexane (IVA). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour la fermeture des cycles à 6 atomes de carbone (UCCIANI, 1974). La diversité des structures établies et des mécanismes proposés pour leur formation peut s'expliquer en premier lieu parce que ces composés ont été obtenus par différents types de traitements thermiques. On peut tenter de classer ceux-ci en 4 catégories :

I. Action de la chaleur en présence de métaux actifs (catalyseurs d'hydrogénation).

II. Action de la chaleur en présence de bases fortes et de solvant.

III. Action de la chaleur seule

IV. Action combinée de la chaleur et de l'oxydation.

Les traitements de type I et II ont permis d'élucider les structures des acides monomères cycliques formés à partir de chaînes triéniques non conjuguées (acide linolénique). Ces travaux ont fait l'objet d'une mise au point très documentée de MIKUSCH et SAGREDOS (1971). Dans le cas des traitements de type *I*, il se forme essentiellement des composés aromatiques monocycliques à noyau benzène (IA) (COENEN *et al.*, 1967) et bicycliques à noyau indane (IB). Par contre, dans le cas des traitements de type *II* il se forme essentiellement des composés monocycliques à noyau cyclohexadiène (IIA) et bicycliques à noyau tétrahydroindane (IIB) accompagnés d'une plus faible quantité d'acides aromatiques (IA). Un schéma approché du mécanisme de la formation de ces composés à partir de l'acide linolénique est montré sur la figure 1.

La cyclisation de chaînes triéniques conjuguées (acides α et β-éléostéariques)

par des chauffages du type *III* a également été bien étudiée. Ces acides triéniques dont les 3 doubles liaisons sont conjuguées se cyclisent très rapidement à des températures qui peuvent être relativement faibles (180 °C) en formant des acides monocycliques qui sont principalement des acides cyclohexadiéniques (IIA) accompagnés d'une plus faible quantité d'acides benzéniques (IA) (SAGREDOS et MIKUSCH 1970).

Il convient de remarquer que les possibilités d'isomérie pour les composés benzéniques (IA) sont relativement restreintes; elles ne concernent que la taille relative des deux chaînes latérales (l'isomère prédominant obtenu à partir de l'acide linolénique est celui pour lequel $n = 3$).

Par contre les possibilités d'isomérie pour les composés cyclohexadiéniques (IIA) sont beaucoup plus nombreuses. En plus de la taille respective des chaînes latérales, elles concernent la position des deux doubles liaisons (sur le cycle, et en position juxta-cyclique). On remarque que ces deux doubles liaisons sont en position conjuguée.

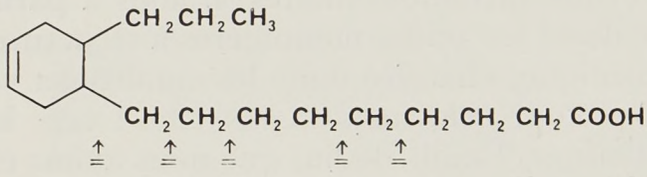
Cependant, les chauffages du type *III* (appliqués à des chaînes grasses ne présentant pas un système triénique conjugué) et du type *IV* ont donné lieu à des conclusions moins bien établies et ils ne sont pas étudiés dans la mise au point de MIKUSCH et SAGREDOS (1971). Aussi nous allons passer brièvement en revue les principaux travaux effectués avec ces deux types de traitements.

Traitements de type III : Action de la chaleur seule (en l'absence de catalyseurs et avec protection contre l'oxydation par l'oxygène atmosphérique).

Dans ces conditions, la cyclisation des chaînes triéniques non conjuguées (esters de l'acide linolénique) ne peut s'effectuer que si la température de chauffage est particulièrement élevée (de l'ordre de 275 °C). Ces conditions (thermopolymérisation) ont été appliquées à du linolénate d'éthyle par MATSUO (1962), ou à de l'huile de lin par MAC DONALD (1956), MC INNES *et al.* (1961), HUTCHISON et ALEXANDER (1963), GAST *et al.* (1963), KUSAKA et MATSUO (1972), SAITO et KANEDA (1976).

Les premiers essais de séparation par chromatographie en phase gazeuse et d'identification ont été effectués par MC INNES *et al.* (1961), ils ont conduit à proposer des structures cyclohexéniques (IIIA).

(IIIA)



Les composés (IIIA) obtenus présenteraient deux doubles liaisons, la première étant localisée sur le cycle et la deuxième sur une des chaînes latérales. Les différents isomères caractérisés se différencieraient par les positions occupées par cette deuxième double liaison sur la chaîne (positions indiquées par les flèches). On remarque que la double liaison sur le cycle et la double liaison sur la chaîne latérale ne sont pas en position conjuguée.

Cependant, les travaux publiés postérieurement font apparaître des divergences dans les structures proposées par les différents auteurs. Ces divergences portent :

— Sur la nature du cycle : la plupart des travaux concluent à la présence d'un cycle à 6 atomes de carbone, alors que GAST *et al.* (1963) postulent l'existence de cycle à 5 atomes de carbone;

— sur la longueur respective des deux chaînes latérales;

— sur la position précise des doubles liaisons sur le cycle ou sur les chaînes latérales.

Ces divergences dans les conclusions peuvent vraisemblablement s'expliquer du fait des difficultés rencontrées par les auteurs dans leurs tentatives de séparation et d'identification. On peut remarquer (ARTMAN, 1969) que malgré des essais de séparation, en particulier par chromatographie en phase gazeuse, les auteurs ne sont pas parvenus à isoler des composés purifiés et que leurs caractérisations ont porté sur des mélanges de plusieurs composés. Par ailleurs, dans leurs tentatives d'identification, la plupart des auteurs n'ont pas eu la possibilité de comparer les caractéristiques physico-chimiques obtenues à celles de composés modèles obtenus par synthèse chimique.

Traitements de type IV : Actions combinées de la chaleur et de l'oxydation. Ces actions ont été appliquées à différentes chaînes grasses insaturées (ne contenant pas d'acides triéniques) chauffées à des températures de l'ordre de 200 °C en présence d'air :

— linoléate de méthyle (MICHAEL *et al.*, 1966) (MICHAEL, 1966*a* et *b*),
— trioléine (PERKINS et ANFINSEN, 1971).
— 1-linoléo-2, 3-distéarine (WANTLAND et PERKINS, 1970),
— huile de soja partiellement hydrogénée (ARTMAN et ALEXANDER, 1968),
— huile de coton (ARTMAN et SMITH, 1972).

Une grande variété de composés à structure cyclique a été décelée, en particulier des acides cyclohexéniques et cyclohexaniques, où une double liaison a pu être localisée dans certains cas (sur le cycle, ou sur une chaîne latérale). Il a été également mis en évidence la présence de composés à cycle aromatique, ainsi que différents esters cycliques portant une fonction cétonique ou une fonction hydroxylique (ARTMAN et SMITH, 1972).

Ce dernier type de traitement *IV* est le plus intéressant d'un point de vue nutritionnel puisqu'il s'agit de corps gras chauffés dans des conditions analogues à celles des opérations de friture. Cependant aucun des travaux d'identification effectués dans ces conditions n'a porté sur des corps gras contenant des chaînes grasses présentant plus de deux doubles liaisons, en particulier de l'acide linolénique.

Comme les traitements de type *I*, *II* et *III* montrent la tendance spécifique des chaînes grasses triéniques (ou présentant plus de 3 doubles liaisons) à se prêter à la formation de cycles intramoléculaires, il nous a paru intéressant de chercher à caractériser et de doser les acides monomères à structure cyclique dans une huile riche en acide linolénique, chauffée dans les conditions voisines de celles utilisées en friture profonde. Pour cela nous avons choisi une huile exceptionnellement riche en acide linolénique, l'huile de lin, que nous avons chauffée en présence d'air à une température de 200 °C (traitement de type *IV*). Par ailleurs à des fins de comparaison, nous avons également utilisé une huile de lin thermopolymérisée à 275 °C à l'abri de l'air (traitement de type *III*).

Nous avons cherché à caractériser les acides cycliques de ces huiles chauffées en séparant leurs esters méthyliques hydrogénés dans un chromatographe en phase gazeuse couplé avec un spectromètre de masse. L'utilisation des esters cycliques hydrogénés (IV) (fig. 1) au lieu des esters cycliques insaturés (II) (III) présente plusieurs avantages :

— On élimine par hydrogénation les possibilités d'isométrie dues au nombre et à la position des doubles liaisons, et on peut espérer obtenir une séparation par chromatographie en phase gazeuse de composés purifiés.

— Les esters cycliques hydrogénés peuvent être séparés des esters linéaires à même nombre d'atomes de carbone par chromatographie en phase gazeuse

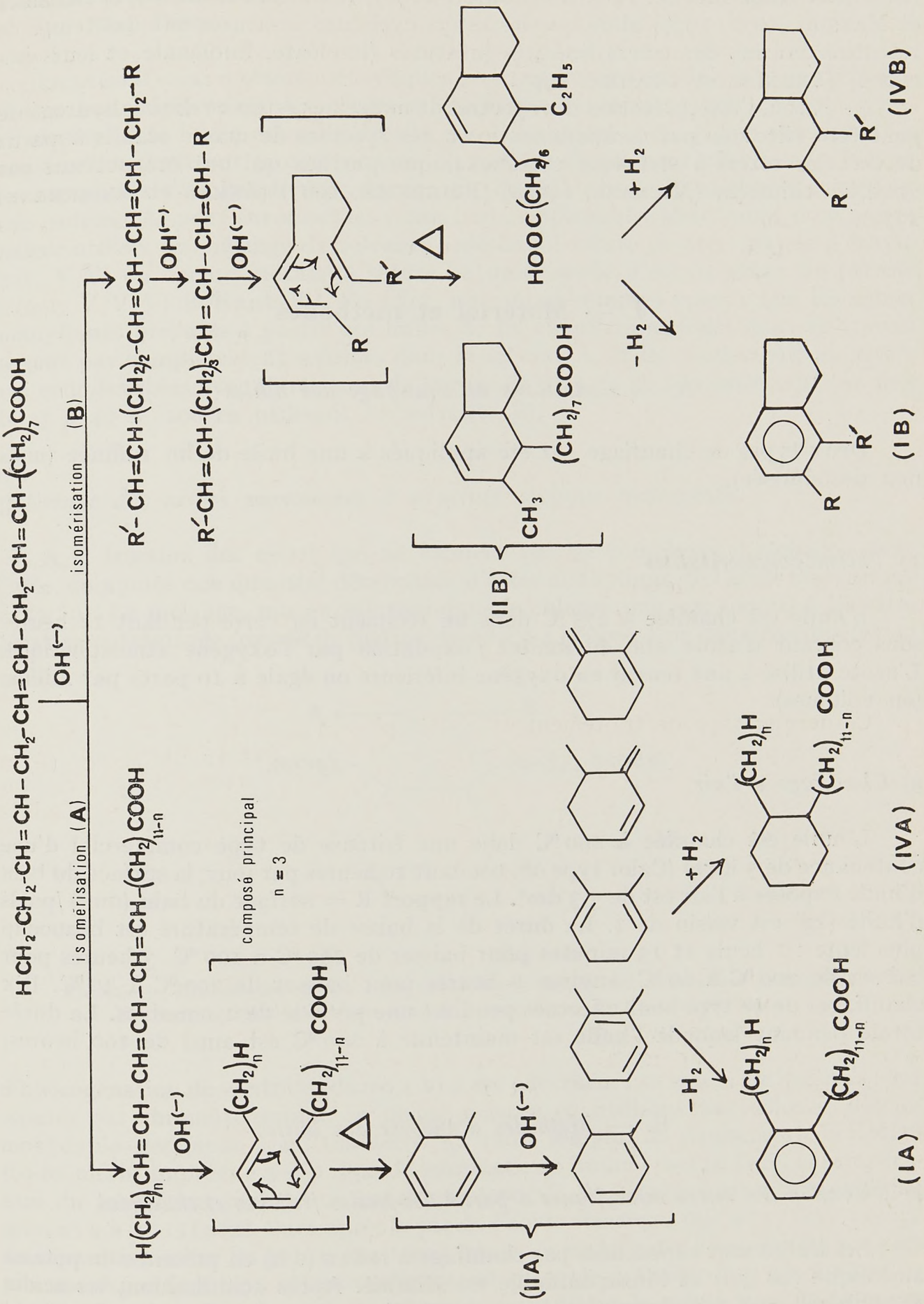


FIG. 1. — *Mécanismes de formation d'acides monomères à structure cyclique à partir de chaînes triéniques à système malonique (acide linolénique) chauffées en présence de base forte et de solvant à des températures* (Δ) *de l'ordre de 220* °C (adapté d'après MIKUSCH et SAGREDOS, 1971).

(BLACK et EISENHAUER, 1963) FRIEDRICH ,(1967) (POTTEAU *et al.*, 1970) (KUSAKA et MATSUO, 1972, 1976) alors que les esters cycliques insaturés ont des temps de rétention voisins des esters linéaires insaturés (linoléate, linolénate et leurs isomères) (PERKINS et IWAOKA, 1973).

— Enfin, l'interprétation des spectres de masse des esters cycliques hydrogénés peut être effectuée par comparaison avec des spectres de masse établis à partir de certains esters à structure cyclohexanique purifiés qui ont été obtenus par synthèse chimique (MICHAEL, 1966*a*) (FRIEDRICH, 1967) (ZEMAN et SCHARMANN, 1973).

I. — Matériel et méthodes

A. — *Conditions de chauffage des huiles*

Deux types de chauffage ont été appliqués à une huile de lin raffinée (mais non désodorisée).

1) *Thermopolymérisation*

L'huile est chauffée à 275 °C dans un récipient en verre pendant 12 heures sous courant d'azote afin de limiter l'oxydation par l'oxygène atmosphérique. L'azote utilisé a une teneur en oxygène inférieure ou égale à 10 parts par million (en volumes).

2) *Chauffage à l'air*

L'huile est chauffée à 200 °C dans une friteuse de type commercial d'une contenance de 5 litres (Calor type 08) pendant 10 heures par jour; la surface du bain d'huile exposée à l'air est de 5,3 dm^2. Le rapport R = surface du bain (dm^2) /poids d'huile (kg) est voisin de 1. La durée de la baisse de température est beaucoup plus lente : 1 heure et 15 minutes pour baisser de 200 °C à 100 °C, 3 heures pour baisser de 200 °C à 60 °C, environ 6 heures pour baisser de 200 °C à 30 °C. Dix chauffages de ce type sont effectués pendant une période de 2 semaines. La durée totale pendant laquelle l'huile est maintenue à 200 °C est ainsi de 100 heures.

B. — *Méthodes d'analyse des huiles*

1) *Obtention des esters méthyliques à partir des huiles fraîches et chauffées*

Les huiles sont saponifiées par chauffage à reflux (2 h) en présence de potasse alcoolique (40 g/l) et l'insaponifiable est éliminé. Après acidification, les acides gras libérés sont transformés en esters méthyliques par chauffage à reflux (2 h) dans le méthanol additionné d'acide chlorhydrique (3 p. 100). Les extractions des acides gras ou des esters méthyliques sont effectuées par le mélange solvant éther de pétrole/oxyde d'éthyle (1/1, V/V).

2) *Mode de fractionnement des esters méthyliques par formation de complexes d'inclusion avec l'urée.*

La prise d'essai d'esters méthyliques pour un dosage est de 5 g et la méthode utilisée pour déterminer les esters méthyliques ne formant pas de complexes d'inclusion avec l'urée est celle décrite par FIRESTONE *et al.* (1961) modifiée. La modification porte sur la composition du solvant choisi pour effectuer le lavage des complexes d'inclusion avec l'urée. Au lieu d'utiliser du méthanol saturé en urée (solvant A) pour entraîner les esters non complexables avec l'urée, nous avons préféré utiliser un mélange de solvants : méthanol saturé en urée /oxyde d'éthyle (1/1, V/V) ou encore méthanol saturé en urée/oxyde d'éthyle/éther de pétrole (2/1/1, V/V/V) (solvants B). En effet, nous nous sommes aperçu que les esters méthyliques préparés à partir des huiles de lin chauffées utilisées dans ce travail ne sont pas complètement solubles dans le solvant A, et les rendements en esters non complexables avec l'urée sont de l'ordre de 27 à 30 p. 100 seulement (au lieu de 37 à 40 p. 100 en utilisant les solvants B).

3) *Dosage des acides monomères à structure cyclique hydrogénés*

A la fraction des esters qui ne forment pas de complexes d'inclusion avec l'urée, on ajoute une quantité déterminée d'ester méthylique de l'acide margarique (C 17 : 0). Le mélange, mis en solution dans le chloroforme, est soumis à l'hydrogénation catalytique (oxyde de platine) pendant 4 heures. Une deuxième opération

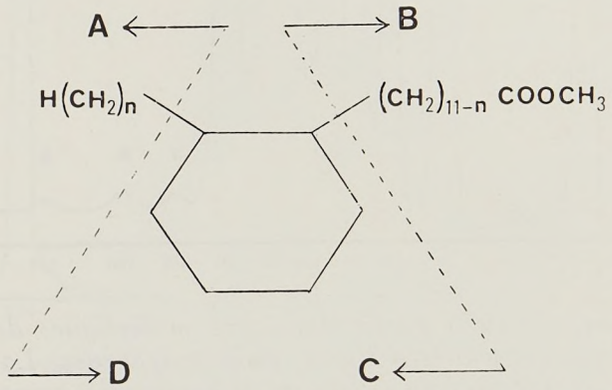


FIG. 2. — *Fragmentation des esters méthyliques des acides monomères hydrogénés à structure cyclohexanique dans la source d'un spectromètre de masse.*

d'hydrogénation de contrôle (durée 4 h) a été effectuée. Les esters hydrogénés sont séparés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne d'acier inoxydable (longueur 3 m, diamètre 3,2 mm) remplie de chromosorb WHMDS (60-80 mesh) imprégné à 8 p. 100 de succinate de butane diol (B D S), la température du four étant maintenue constante (200 °C). Les esters à structure cyclique (pics n° 2 à n° 11) sont élués après le pic de l'acide stéarique (pic n° 1) (fig. 3 et 4). La séparation entre les pics n'étant pas totale, la surface des aires situées sous les pics correspondant aux esters cycliques est mesurée à l'aide d'un planimètre.

Des essais ont également été effectués en utilisant le même type de colonnes remplies d'un support imprégné avec d'autres phases : succinate de diéthylène glycol (DEGS), Carbowax 20M, et Apiezon L. Avec les phases DEGS et Carbowax 20 M l'ordre d'élution des principaux pics (n° 1 à 6) est apparemment le même

qu'avec la phase BDS, mais leur résolution est moins bonne. Avec la phase Apiezon L, l'ordre d'élution des principaux pics correspondant aux esters cycliques hydrogénés (pics n° 2 à 6) est le même qu'avec la phase BDS, mais le pic n° 1 (correspondant au stéarate de méthyle) est élué entre les pics n° 3 et n° 4 dont il est mal séparé. Des essais ont également été effectués avec des colonnes capillaires (50 m × 0,25 mm) en utilisant une phase stationnaire EGSS X et une phase Apiezon L. Avec ce type de colonnes, nous avons obtenu une meilleure résolution entre les pics. Nous avons pu vérifier que certains épaulements constatés devant

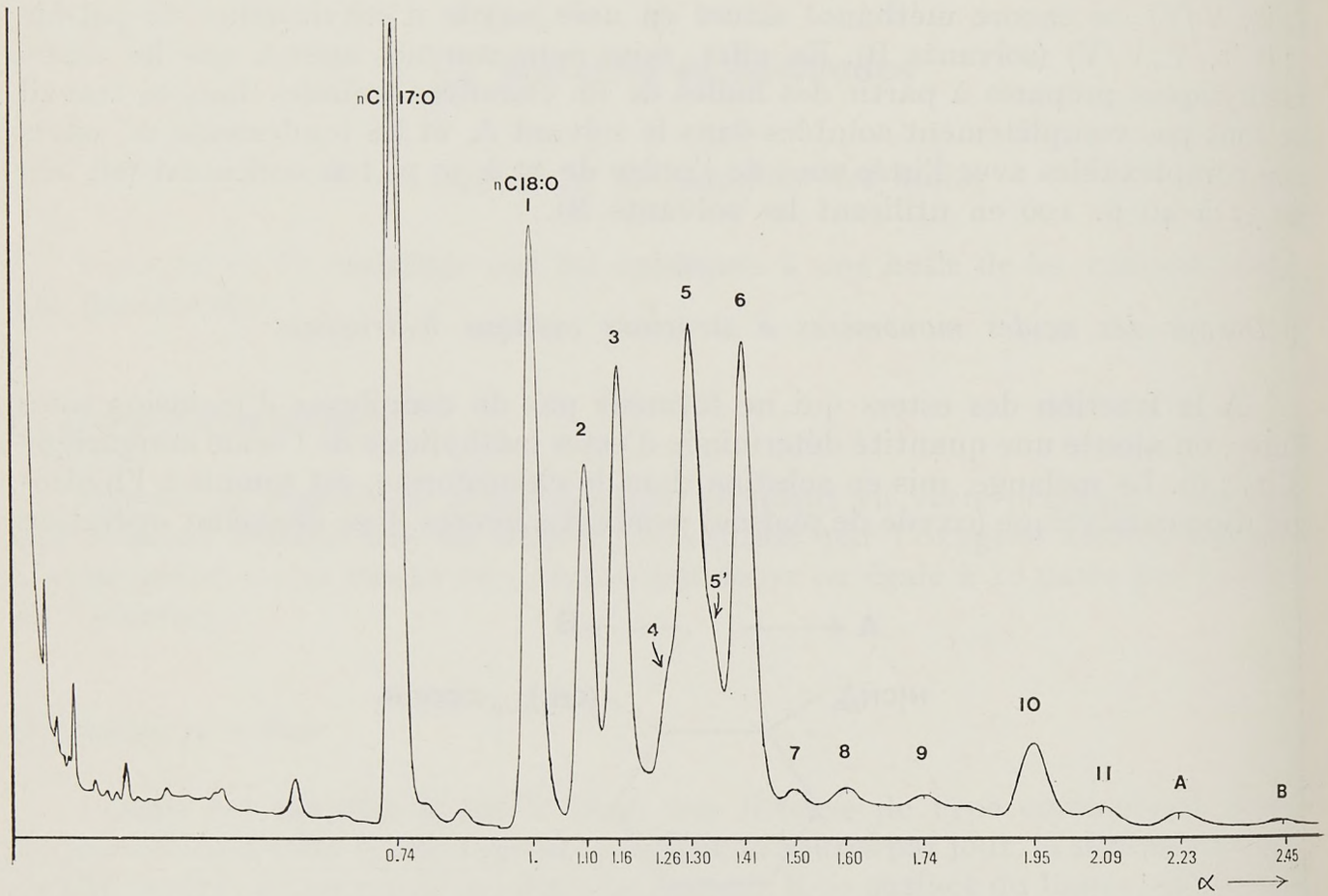


FIG. 3. — *Chromatogramme obtenu à partir des esters méthyliques de l'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C, qui ont été traités à l'urée, puis hydrogénés. La chromatographie en phase gazeuse a été effectuée en utilisant du succinate de butane diol comme phase stationnaire. On a porté en abcisse le temps de rétention relatif α (par rapport au stéarate de méthyle).*

(épaulement n° 4) ou derrière (épaulement n° 5') un pic majeur (pic n° 5), en utilisant des colonnes remplies, correspondaient réellement à la présence de composés additionnels. Dans d'autres cas, certains pics mineurs (en particulier pics n° 9 à 11) ne sont pas purs et correspondent manifestement à la présence de plusieurs composés. Cependant nous n'avons pas eu la possibilité de coupler ce type de colonnes avec le spectromètre de masse pour vérifier l'identité des composés responsables de ces pics additionnels.

4) *Couplage chromatographe en phase gazeuse-spectromètre de masse*

On utilise un chromatographe en phase gazeuse (Girdel modèle 3000) couplé à un spectromètre de masse (Varian MAT CH5) par l'intermédiaire d'un séparateur

d'hélium du type proposé par WATSON et BIEMAN. Le chromatographe est équipé du même type de colonne remplie ayant servi au dosage des acides monomères à structure cyclique en utilisant le succinate de butane diol (BDS) comme phase stationnaire. La colonne est parcourue par de l'hélium et la température est maintenue à 195 °C. Des essais ont également été effectués en utilisant comme phase stationnaire de l'Apiezon L à une température de 210 °C.

La source du spectromètre de masse est maintenue à 250 °C. La cathode, parcourue par un courant de 100 μA, émet des électrons dont l'énergie est de 70eV.

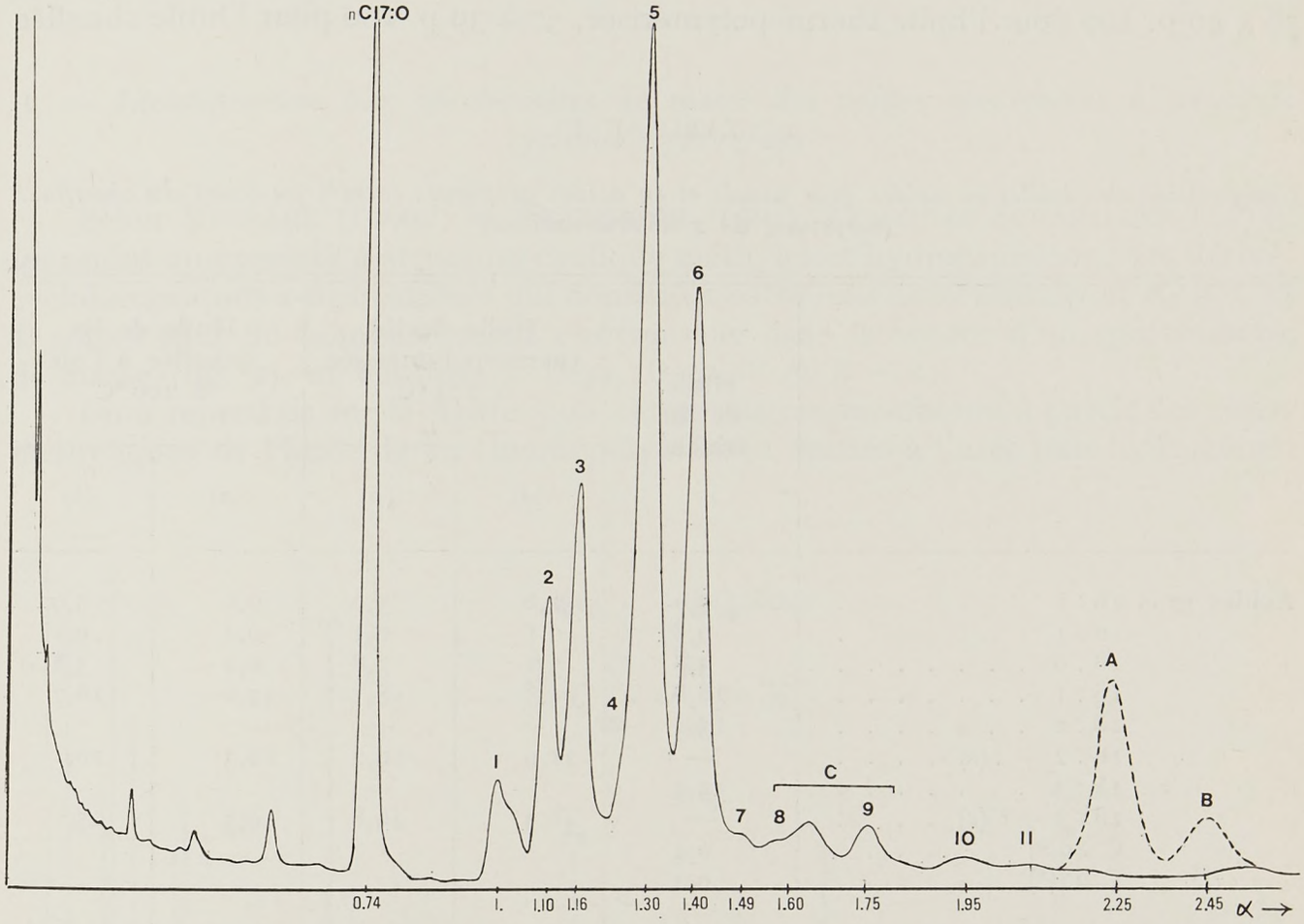


FIG. 4. — *Chromatogramme obtenu à partir des esters méthyliques de l'huile de lin chauffée à l'air à 200 °C, qui ont été hydrogénés, puis traités à l'urée. Les conditions de chromatographie en phase gazeuse sont les mêmes que celles utilisées pour la figure 3.*

5) *Chromatographie sur couche mince*

Les esters méthyliques hydrogénés ne formant pas de complexes avec l'urée sont séparés par chromatographie sur couche mince en utilisant des plaques de verre (20 × 20 cm) recouvertes d'une couche (0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice G (Merck) activées à 120 °C. Le solvant d'élution est un mélange hexane-oxyde d'éthyle (80/20, V/V). Après revélation avec une solution de dichlorofluorescéine dans l'éthanol on récupère deux bandes :

— bande 1 (Rf = 0,60 à 0,75) qui contient le margarate de méthyle et les esters méthyliques des acides gras saturés linéaires et des acides à structure cyclique hydrogénés (pics n° 2 à 11) provenant des huiles chauffées;

— bande 2 (Rf = 0,40 à 0,50) qui contient les composés A et B (méthoxydes).

II. — Résultats

A. — *Composition des huiles fraîche et chauffée*

On a reporté sur le tableau I la composition des huiles étudiées en acides gras usuels et en composés atypiques. On a utilisé deux méthodes différentes pour estimer la quantité d'acides atypiques formés au cours des opérations de chauffage (deux dernières lignes du tabl. I). Ces deux méthodes donnent des résultats voisins : 38 à 40 p. 100 pour l'huile thermopolymérisée, 37 à 39 p. 100 pour l'huile chauffée

TABLEAU I

Composition des huiles en acides gras usuels et en acides atypiques formés au cours du chauffage (moyennes de 2 déterminations)

	Huile de lin fraîche	Huile de lin thermopolymérisée à 275 °C		Huile de lin chauffée à l'air à 200 °C	
		(*a*)	(*b*)	(*a*)	(*b*)
Acides gras 16 : 0	5,6	7,6	5,6	9,0	5,6
16 : 1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
18 : 0	3,8	5,1	3,8	6,2	3,8
18 : 1	18,8	24,5	18,1	27,0	16,7
18 : 2	15,4	—	—	—	—
18 : 2 + ?(*c*)	—	21,9	16,2	16,3	10,1
18 : 3	55,9	—	—	—	—
18 : 3 + ? (*c*)	—	40,3	29,8	40,5	25,1
C 20(*e*)	0,4				
C 22(*e*)	0,2				
Coefficient K(*d*)		0,7376		0,6206	
Acides non chromatographiés (polymérisés ou oxydés)(*d*)	—		26,2		37,9
Acides monomères cycliques	traces (0,03)		11,5		1,1
Acides atypiques (somme des deux lignes précédentes)	—		37,7		39,0
Acides non complexables à l'urée	5,8		39,9		37,3

(*a*) p. 100 des acides gras analysés par chromatographie en phase gazeuse.
(*b*) Colonne (*b*) = Colonne (*a*) × K (voir note *d*).
(*c*) 18 : 2 (ou 18 : 3) + autres composés mal séparés présents dans l'huile chauffée.
(*d*) Les polymères et/ou les acides oxydés sont calculés en supposant que la quantité totale des acides saturés (16 : 0 et 18 : 0) demeure inchangée par le chauffage.

$$K = \frac{\text{p. 100 16 : 0 + p. 100 18 : 0 dans l'huile de lin fraîche}}{\text{p. 100 16 : 0 + p. 100 18 : 0 dans l'huile de lin chauffée}}$$

p. 100 polymères et/ou acides oxydés = 100(1 — K).
(*e*) Identifiés et dosés dans les esters méthyliques hydrogénés de l'huile de lin fraîche.

à l'air. Les deux huiles chauffées paraissent donc globalement aussi dégradées l'une que l'autre.

L'huile chauffée à l'air présente une teneur en acides polymérisés et /ou oxydés plus importante (38 p. 100) que celle de l'huile thermopolymérisée (26 p. 100). Par contre, la teneur en acides monomères à structure cyclique de l'huile thermopolymérisée (11,5 p. 100) est 10 fois supérieure à celle de l'huile chauffée à l'air (1.1 p. 100).

Par ailleurs, on constate que la dégradation des huiles est accompagnée par la disparition d'une quantité importante des acides gras polyinsaturés en particulier de l'acide linolénique.

B. — *Identification par spectromètre de masse des acides monomères à structure cyclique hydrogénés*

Selon MICHAEL (1966*a*, *b*), FRIEDRICH (1967), ZEMAN et SCHARMANN (1973), les acides monomères à structure cyclique méthylés et hydrogénés sont des dérivés cyclohexaniques α-disubstitués qui donnent quatre ions caractéristiques A, B, C et D sous l'effet du bombardement électronique dans la source d'un spectromètre de masse (fig. 2), et des ions à D-32, D-32-18 et B + 1.

On a reproduit sur la figure 3 un chromatogramme obtenu à partir des esters méthyliques de l'huile de lin thermopolymérisée, traités à l'urée puis hydrogénés.

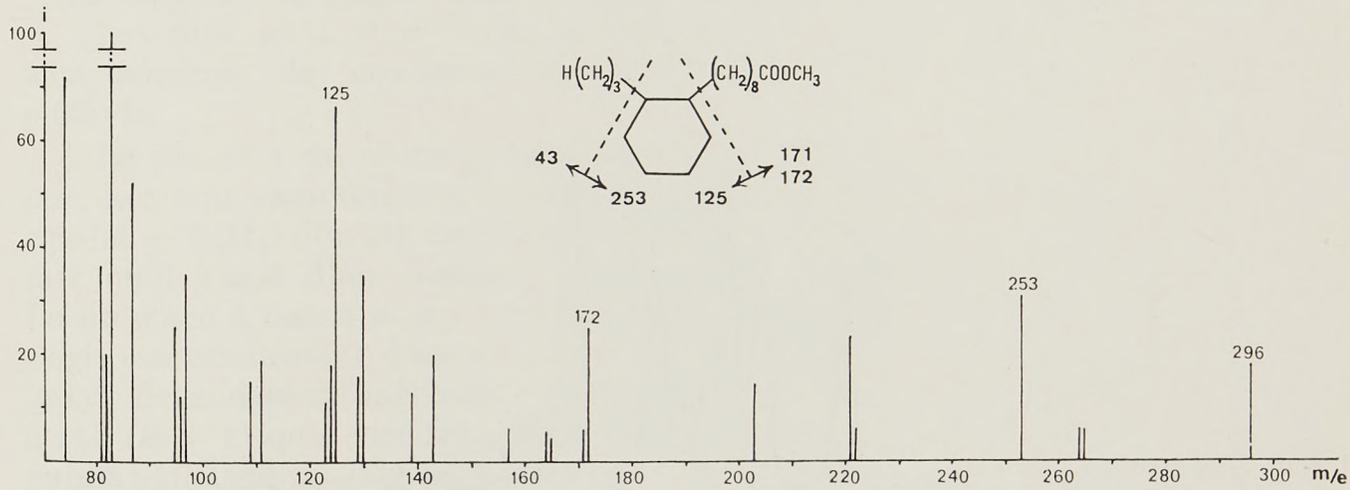


FIG. 5. — *Spectre de masse correspondant au pic n° 6 du chromatogramme* (fig. 3).

Le spectre de masse (fig. 5) correspondant aux pics n° 5 et n° 6 du chromatogramme (fig. 3) montre qu'il s'agit des isomères cis et trans du 9-(2′-*n*-propylcyclohexyl)-nonanoate de méthyle (cf. fig. 2 pour $n = 3$). En effet, les ions les plus intéressants du spectre apparaissent à $m/e = 296$ (M^+), à $m/e = 125$ (ion C), à $m/e = 171$ (ion B) et surtout à $m/e = 172$ (ion B + 1 après réarrangement d'un hydrogène), et à $m/e = 253$ (ion D). Cet ion à $m/e = 253$ se fragmente à son tour, et perd successivement une molécule de méthanol ($m/e = 221$) puis une molécule d'eau ($m/e = 203$), comme le prouve la présence d'ions métastables à $m/e = 193$ et 186,4. Ces fragmentations sont en accord avec celles indiquées par FRIEDRICH (1967) sur lesquelles nous nous basons pour ce qui est de la position des substituants sur le cycle. Le spectre de masse du pic n° 6 (fig. 5) est analogue à celui publié par ZEMAN et SCHARMANN (1973, fig. 21).

Lors de la chromatographie sur des phases de polyesters les pics n° 5 et n° 6 ont des volumes de rétention relatifs α (par rapport au stéarate de méthyle) respectivement de 1,30 et 1,40 (sur phase BDS), de 1,31 à 1,35 et 1,42 à 1,46 (sur phase DEGS), de 1,32 et 1,44 (sur phase EGSS X). Ces valeurs sont voisines de celles observées par KUSAKA et MATSUO (1972) : α = 1,32 et 1,39 (sur phase DEGS). Lors de la chromatographie sur des phases apolaires d'Apiezon L, les pics n° 5 et n° 6 (α = 1,03 à 1,04 et 1,09 à 1,10) sont élués après le stéarate de méthyle, comme l'a observé FRIEDRICH (1967) en utilisant une phase d'Apiezon M.

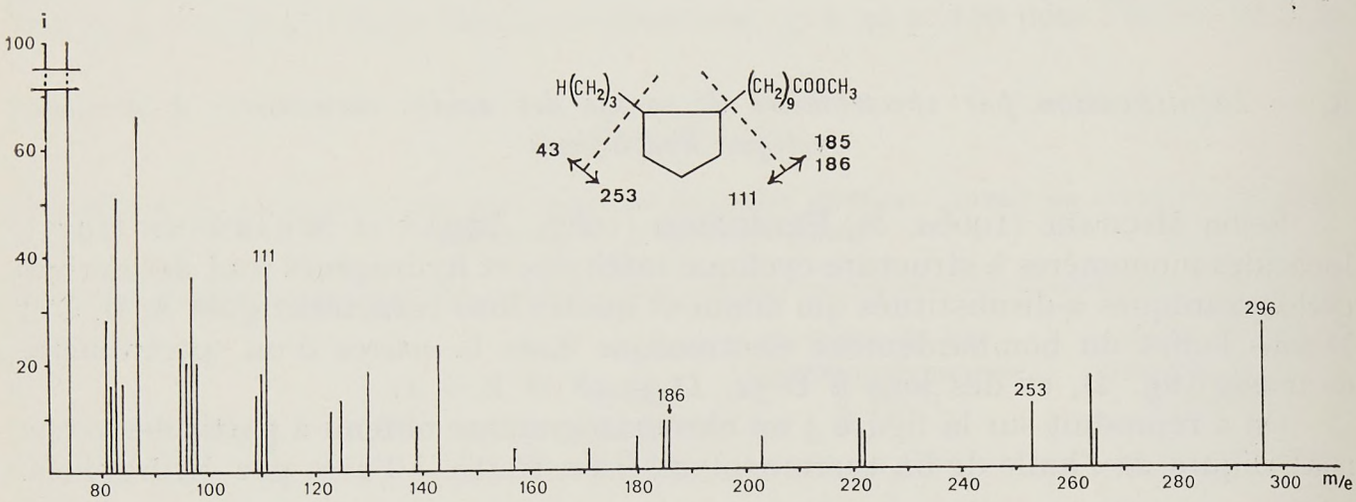


FIG. 6. — *Spectre de masse correspondant au pic n° 3 du chromatogramme* (fig. 3).

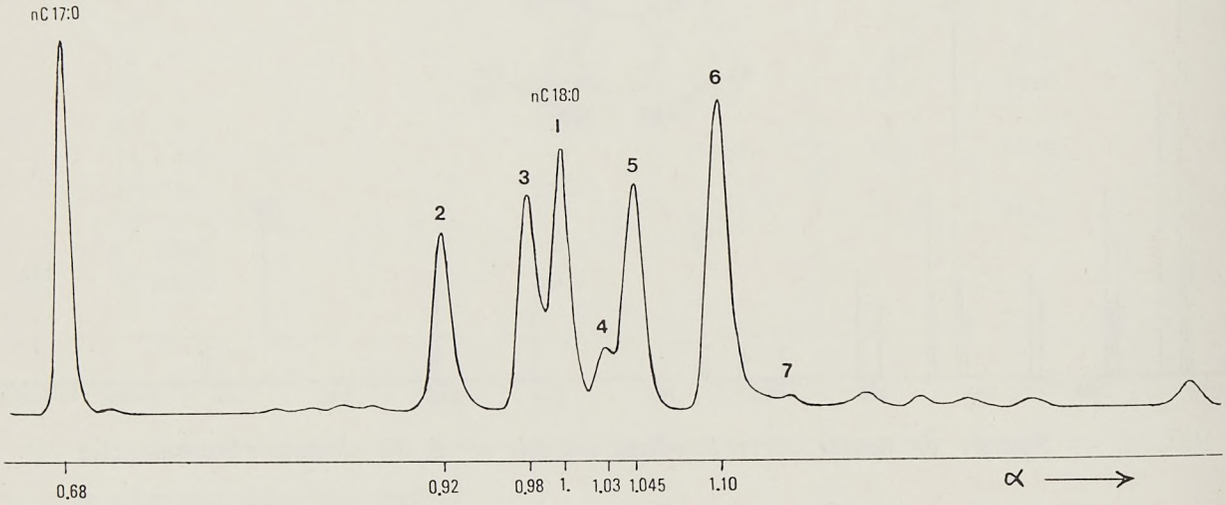


FIG. 7. — *Chromatogramme obtenu en utilisant une colonne capillaire (50 m × 0,25 mm) et une phase stationnaire d'Apiezon L à 220 °C. L'échantillon analysé est le même que celui utilisé sur la figure 3. On a porté en abcisse le temps de rétention relatif α (par rapport au stéarate de méthyle)*

La figure 6 représente le spectre de masse du composé responsable du pic n° 3 du chromatogramme (fig. 3). Ce spectre présente certaines similitudes avec celui de la figure 5, puisqu'on y retrouve les ions à $m/e = 296$ (M^+), à $m/e = 253$ (ion D), à $m/e = 221$ (253 — CH_3OH) et à $m/e = 203$ (221 — H_2O). On peut donc déjà penser qu'il s'agit d'un composé monocyclique possédant un substituant propyle. Mais ce spectre diffère de celui de la figure 5 par la présence d'un ion très intense à $m/e = 111$ au lieu de 125 (ion C), et par la présence des ions à $m/e = 185$ et 186 au lieu de 171 et 172 (ions B et B + 1). Nous supposons que ce composé est le 10-

(2′-*n*-propylcyclopentyl) décanoate de méthyle, mais nous n'avons pas la possibilité de le vérifier, ce composé n'ayant pas été caractérisé par spectrométrie de masse par FRIEDRICH (1967) ni par d'autres auteurs à notre connaissance. Cependant, SEN GUPTA et PETERS (1969), ZEMAN et SCHARMANN (1973, fig. 19) ont publié un spectre de masse obtenu à partir d'un acide cyclopentanique monosubstitué, le 10-(cyclopentyl) décanoate de méthyle. Ils obtiennent des pics caractéristiques à *m/e* 185, 186, 187 ([CH_2] $COOCH_3$, + H, + 2H) montrant que l'élimination de la chaîne portant la fonction ester se fait suivant une coupure adjacente au cycle cyclopentane (coupure en α). Cette observation a été également faite par CHRISTIE *et al.* (1969) à partir d'esters méthyliques de différents acides à noyau cyclopentane monosubstitués. Par contre CHRISTIE *et al.* (1969) montrent que les mêmes types de composés dont le noyau contient une double liaison se fragmentent suivant une coupure en β par rapport au cycle cyclopentane.

Le volume de rétention relatif α (par rapport au stéarate de méthyle) du (ou des) composés responsables du pic n° 3 du chromatogramme est de 1,16 (sur phase BDS), de 1,16 à 1,20 (sur phase DEGS), de 1,18 (sur phase EGSS X) et de 0,96 à 0,98 (sur phase Apiezon L). Avec toutes les phases utilisées le pic n° 3 est élué avant les pics n° 5 et n° 6. SEN GUPTA et PETERS (1969) SCHOGT et BEGEMAN (1965) ont observé que les esters cyclopentaniques monosubstitués sont élués par chromatographie en phase gazeuse avant les esters cyclohexaniques monosubstitués (à même masse moléculaire) en utilisant des phases de polyesters (Reoplex, PEGA) ou d'Apiezon L. Le comportement chromatographique du composé principal responsable du pic n° 3 apporte donc un argument supplémentaire à l'hypothèse selon laquelle il s'agit d'un composé à noyau cyclopentane.

Les pics n° 2 et n° 4 du chromatogramme (fig. 3) peuvent correspondre aux isomères de configuration du 8 (2′-*n*-butyl-cyclohexyl) octanoate de méthyle.

Le pic n° 2 du chromatogramme (fig. 3) paraît correspondre à un composé pur. Les ions caractéristiques observés sur le spectre de masse à *m/e* = 296 (M^+), 239 (M — C_4H_9) (ion D), 207 (239 — CH_3OH), 189 (207 — H_2O) permettent d'affirmer qu'il s'agit d'un composé monocyclique possédant un substituant butyle. La présence d'ions à *m/e* = 139 (ion C) et 157 (ion B) permettent de penser qu'il s'agit essentiellement d'un isomère à noyau cyclohexanique : le 8(2′-*n*-butylcyclohexyl) octanoate de méthyle. Cependant, on n'observe l'ion après réarrangement à 158 (B + 1) qu'à une très faible intensité. Un spectre de masse analogue a été publié par MICHAEL (1966*a*) à partir de 8 (2′-butyl-cyclohexyl) octanoate de méthyle purifié obtenu par synthèse chimique. MICHAEL indique la présence d'un ion à *m/e* = 157, mais n'indique pas la présence de l'ion avec réarrangement d'un hydrogène à *m/e* = 158. Cependant nous observons sur le spectre de masse correspondant au pic n° 2 du chromatogramme, la présence de deux ions à 171 et surtout à 172 (d'intensité du même ordre de grandeur que l'ion à 157) et d'un ion intense à *m/e* = 125 (beaucoup plus intense que l'ion à 139). Comme MICHAEL (1966*a*) ne signale pas la présence de ces ions (171, 172 et 125) sur le spectre de masse correspondant à l'ester cyclohexanique à substituant butyle obtenu par synthèse nous pensons que ces ions pourraient correspondre à la présence additionnelle d'un composé à noyau cyclopentane qui pourrait être le 9 (2′-*n*-butyl cyclopentyl) nonanoate de méthyle.

Nous avons observé que les volumes de rétention relatifs (α) du (ou des) composé responsable du pic n° 2 du chromatogramme sont de 1,10 (sur une phase BDS cf : figure 3) de 1,11 à 1,13 (sur une phase DEGS) de 1,12 (sur une phase EGSS X) et de 0,91 à 0,92 (sur une phase d'Apiezon L). Les volumes de rétention

relatifs α que nous avons observés sur les phases de polyesters sont inférieurs à ceux publiés par KUSAKA et MATSUO (1972, 1976) à partir des deux isomères de configuration du 8 (2′-*n*-butyl cyclohexyl) octanoate de méthyle obtenus par synthèse (respectivement : $\alpha = 1{,}23$ et $1{,}30$). Par ailleurs, nous avons observé que lors de la chromatographie sur une phase apolaire (Apiezon L) ce (ou ces) composé est élué avant le stéarate de méthyle ($\alpha = 0{,}91$ à $0{,}92$) alors que FRIEDRICH (1967) observe que les deux isomères correspondant au 8-(2′-*n*-butyl cyclohexyl) octanoate de méthyle sont élués après le stéarate de méthyle en utilisant une phase apolaire (Apiezon M). Le comportement chromatographique du (ou des) composé responsable du pic n° 2 du chromatogramme apporte donc des arguments additionnels à l'hypothèse selon laquelle ce pic ne correspondrait pas principalement à un isomère d'un ester cyclohexanique à substituant butyle, mais plutôt à un ester cyclopentanique à substituant butyle.

Le pic n° 4 est mal séparé du pic n° 5 par chromatographie en phase gazeuse en utilisant des colonnes remplies avec un support imprégné avec des phases de polyesters (BDS et DEGS) ou d'Apiezon L. Il constitue un épaulement précédant le pic n° 5. Le spectre de masse obtenu pour ce pic se superpose donc à celui obtenu pour le pic n° 5. En plus des ions caractéristiques de la présence du pic n° 5 (fig. 5) observés en grande abondance, nous observons des ions caractéristiques de la présence du pic n° 4 à $m/e = 239, 207, 189, 157, 158$ (faible) et 139. Bien que les ions à 157 et 139 ne soient pas caractéristiques, puisqu'ils sont également observés par ZEMAN et SCHARMANN (1973, fig. 21) à partir du 9-(2′-*n*-propylcyclohexyl)-nonanoate de méthyle, et peuvent donc correspondre à la présence du pic n° 5 les ions à 239, 207 et 189 sont caractéristiques de la présence de composé monocyclique à substituant butyle. Le volume de rétention relatif (α) du pic n° 4 est de 1,26 (sur phase BDS) et de 1,29 (sur phase DEGS). KUSAKA et MATSUO (1976) ont indiqué des valeurs α de 1,23 et 1,29 à 1,30 (sur phase DEGS) pour les 2 isomères du 8(2′-*n*-butyl cyclohexyl) octanoate de méthyle obtenu par synthèse. Nous supposons donc que le pic n° 4 correspond à l'un de ces deux isomères.

Les pics n° 7 et n° 8 du chromatogramme (fig. 3) peuvent correspondre aux isomères cis et trans du 10-(2′-éthyl cyclohexyl) décanoate de méthyle.

En effet des ions caractéristiques sont observés à $m/e = 296$ (M^+), 267 ($M - C_2H_5$) (ion D), 235 ($267 - CH_3OH$),217 ($235 - H_2O$), 185 (ion B) et surtout à 186 (B + 1), (l'ion à 186 étant beaucoup plus intense que l'ion à 185), et à 111 (ion C) (très intense). On retrouve également la présence des ions caractéristiques des pics n° 5 et n° 6, en particulier dans le spectre de masse du pic n° 7, correspondant sans doute à la trainée du pic n° 6. Les volumes de rétention relatifs α pour les pics n° 7 et n° 8 sont de l'ordre de 1,50 et 1,60 (sur phase BDS) ils sont voisins de ceux observés par KUSAKA et MATSUO (1976) lors de la chromatographie sur phase DEGS ($\alpha = 1{,}44$ et $1{,}48$) pour les 2 isomères du 10-(2′-éthyl cyclohexyl) décanoate de méthyle obtenus par synthèse.

Sur les spectres de masse des pics n° 7 et n° 8, on observe également la présence d'ions de faible intensité à 199 et surtout 200 (B et B + 1), et d'un ion intense à 97(C), suggérant la présence additionnelle soit d'un ester cyclopentanique à substituant éthyle, soit d'un ester cyclohexanique à substituant méthyle. La présence d'un ion à $m/e = 281$ (D) pourrait confirmer cette dernière hypothèse.

KUSAKA et MATSUO (1972) ont observé que les deux isomères de l'ester cyclohexanique à substituant méthyle ont des volumes de rétention relatifs $\alpha = 1{,}50$ et $1{,}58$ (sur phase DEGS). Ils observent que le premier de ces deux isomères a un comportement chromatographique ($\alpha = 1{,}50$) voisin du deuxième isomère de l'ester cyclohexanique à substituant éthyle ($\alpha = 1{,}48$). La même observation a

été effectuée par FRIEDRICH (1967) (sur phase d'Apiezon M). On peut donc faire l'hypothèse de la présence simultanée de ces deux composés dans le pic n° 8.

Le pic n° 9 du chromatogramme (fig. 3) pourrait correspondre à un isomère du 11-(2'-méthyl cyclohexyl) undécanoate de méthyle. Des ions sont observés à $m/e = 296$ (M^+), 199 (B), 200 (B + 1) et 97 (C).

Un pic de faible intensité est également observé à $m/e = 281$ (D) mais on n'observe pas d'ions à $m/e = 249$ (281 — CH_3OH) et 231 (249 — H_2O). L'absence de ces derniers ions a été antérieurement constatée par FRIEDRICH (1967).

Cependant la présence d'un ion à 294 (d'intensité du même ordre que celle à 296) indique manifestement que le pic n° 9 n'est pas pur et correspond à plusieurs composés. Le volume de rétention relatif correspondant au pic n° 9 ($\alpha = 1{,}75$ sur phase BDS) est un peu plus élevé que celui correspondant au deuxième isomère du 11-(2'-méthyl cyclohexyl) undecanoate de méthyle ($\alpha = 1{,}58$ sur phase DEGS) signalé par KUSAKA et MATSUO (1972).

Le pic n° 10 du chromatogramme (fig. 3) pourrait correspondre à un éthylhexahydroindanyl heptanoate de méthyle. Des pics caractéristiques sont obtenus sur le spectre de masse à $m/e = 294$ (M^+), 265 (M — C_2H_5), 263 (M — CH_3O), 233 (265 — CH_3OH), 215 (233 — H_2O), 151 (M — $[CH_2]_6$ $COOCH_3$), 143 ($[CH_2]_6$ $COOCH_3$), 144 (143 + H) faible, et on observe la série d'ions $C_n H_{2n} - 3$ (67, 81, 95, 109, 123, 137) dont le dernier terme (151) pourrait correspondre à l'ion éthylhexahydroindanyl. Il s'agirait donc d'un composé bicyclique semblable à l'un de ceux qui ont été identifiés par ECKERT *et al.* (1969) et SAGREDOS (1974). Il convient de remarquer qu'avec le type de colonne (phase BDS) que nous avons utilisée, ce composé bicyclique a un temps de rétention relatif ($\alpha = 1{,}95$) voisin de celui de l'ester de l'acide linéaire C 20 : 0 ($\alpha = 1{,}83$), il est élué généralement juste derrière ce dernier. Les acides en C 20 (C 20 : 0 et C 20 : 1) sont présents en quantité très faible (0,4 p. 100) dans l'huile de lin et le fractionnement à l'urée permet de les exclure complètement de la fraction des esters qui ne forment pas de complexes d'inclusion avec l'urée. Cependant, dans le spectre de masse correspondant au pic n° 10, nous observons la présence d'ions à $m/e = 296$ (d'intensité beaucoup plus faible que celle de l'ion à $m/e = 294$), 281, 264, 222, 200, 199, 180 et d'une série d'ions $C_n H_{2n} - 1$ (139, 125, 111, 97, 83, 69, 55). Certains de ces ions ne sont pas présents dans le spectre de masse publié par ECKERT *et al.* (1969), d'autres sont présents mais ils sont moins intenses que dans le spectre de masse correspondant au pic n° 10. Ces constatations montrent que le pic n° 10 n'est pas pur et correspond manifestement à la présence de plusieurs composés.

Enfin le pic n° 1 (figure 3) correspond principalement à du stéarate de méthyle (M^+ à $m/e = 298$). Il provient essentiellement de l'hydrogénation des esters méthyliques polyinsaturés à chaîne linéaire qui sont incomplètement éliminés lors du traitement à l'urée.

On a reproduit sur la figure 4 un chromatogramme obtenu à partir des esters méthyliques de l'huile de lin chauffée à l'air à 200 °C hydrogénés puis traités à l'urée. Le fait d'effectuer le traitement à l'urée après l'hydrogénation présente l'avantage d'éliminer en grande partie le stéarate de méthyle (pic n° 1) provenant des esters polyinsaturés. On retrouve les esters des acides monomères à structure cyclique qui présentent les mêmes temps de rétention que sur la figure 3 et qui ont des spectres de masse analogues à ceux qui ont été interprétés précédemment à partir de l'huile de lin thermopolymérisée. Cependant, seuls les pics n° 2 à 7 de la figure 6 ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse, les autres pics n'étant caractérisés que par leurs temps de rétention relatifs (α).

Il convient de remarquer que les pics n° 2 à 11 du chromatogramme (figure 3)

ne correspondent manifestement pas dans tous les cas à des composés purs et que les structures proposées correspondent vraisemblablement aux composés prédominants pour chacun de ces pics. Par chromatographie en phase gazeuse, on voit que le pic n° 5 présente deux épaulements marqués 4 et 5′ (fig. 3). La chromatographie sur une colonne capillaire (phase EGSSX) confirme la présence d'au moins 3 pics majeurs 4, 5 et 5′. Nous avons supposé que l'épaulement 4 correspond à la présence d'un isomère du 8(2′-*n*-butyl cyclohexyl) octanoate de méthyle. Cependant, le spectre de masse ne nous a donné aucune information utile sur la nature du (ou des) composés responsables de l'épaulement 5′. Par ailleurs, bien que les pics n° 2 et 3 paraissent correspondre par chromatographie à des composés purs, les spectres de masse montrent la présence d'ions de faible intensité qui pourraient correspondre aux ions C, D, D-32, D-32-18 d'esters cyclohexaniques (cf. fig. 2) où $n = 4$ à 10. D'autres ions caractéristiques de certains esters cyclohexaniques où $n \geqslant 4$ (ZEMAN et SCHARMANN, 1973) sont également observés à $m/e = 278$ (M — H_2O) ($n = 4$ à 9); à $m/e = 264$ (M — CH_3OH) (264 > 265 pour $n = 6$, 7 et 8); à $m/e = 152$, 166, 180, 194, 222 (ions C — H) ($n = 5$, 6, 7, 8, 10); à $m/e = 220$ (M — 76) ($n = 7$ et 8). Cependant, les ions observés à $m/e = 264$,

TABLEAU 2

Teneurs approximatives (en p. 100) des différents pics n° 2 à n° 11 séparés par chromatographie en phase gazeuse

Caractéristiques chromatographiques (phase BDS)		Huile de lin thermopolymérisée à 275 °C		Huile de lin oxydée à 200 °C	
Temps de rétention relatif (α)	Longueur de chaîne équivalente (LEC)	Pic n° (fig. 3)	Teneur p. 100(*a*)	Pic n° (fig. 4)	Teneur p. 100(*a*)
1,00	18,00	1		1(*b*)	
1,10	18,30	2	14	2	10
1,16	18,50	3	19	3	15
1,26	18,75	4	30	4	37
1,30	18,90	5 + 5′ (*b*)		5	
1,40	19,15	6	24	6	27
1,50	19,35	7	2	7	2
1,60	19,55	8	2	C(*b*)	6
1,75	19,85	9	2		
1,95	20,25	10	6	10(*c*)	1
2,09	20,45	11(*c*)	2	11(*c*)	1
2,25	20,70	A		A	
2,45	21,00	B		B	

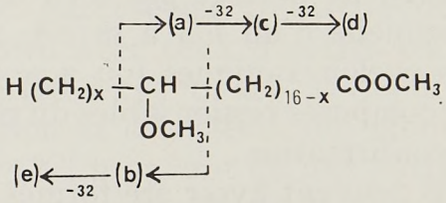
(*a*) Teneur en p. 100 de la somme des surfaces sous les pics n° 2 à n° 11.
(*b*) Correspond à plusieurs pics mal séparés lors du couplage chromatographie en phase gazeuse — spectrométrie de masse.
(*c*) Ces composés n'ont pas été caractérisés par spectrométrie de masse.

222 et 180 pourraient également correspondre à des traces d'esters méthyliques d'acides gras monoéniques en C 18.

Les pics n° 2 à 11 des figures 3 et 4 ont été obtenus à partir des esters méthyliques hydrogénés séparés par chromatographie sur couche mince (R*f* = 0,75 à 0,60).

Nous avons également chromatographié les esters méthyliques non séparés par chromatographie sur couche mince. En plus des pics n° 2 à 11 nous avons observé la présence de deux pics prédominants A et B. Le comportement de ces deux pics lors de la chromatographie sur couche mince (R*f* = 0,50 à 0,40) et lors de la chromatographie en phase gazeuse (α = 2,25 et 2,45, L.E.C. = 20,7 et 21,0) suggère qu'il s'agit d'esters méthyliques présentant une fonction méthoxyde. Lors de la chromatographie sur couche mince de silica gel, en utilisant un mélange hexane/oxyde d'éthyle (80/20) comme solvant d'élution, MINNIKIN *et al.* (1974) observent que les esters méthyliques de divers acides gras ne présentant pas de fonction oxygénée sur la chaîne grasse ont tous un R*f* de 0,66, les esters d'acides gras présentant une fonction méthoxyde ont un R*f* de 0,51, et les acides gras présentant 2 ou 3 fonctions méthoxydes ont un R*f* inférieur à 0,40. Lors de la chromatographie en phase gazeuse en utilisant des phases de polyesters, les monométhoxydes d'esters méthyliques sont élués entre les esters en C 20 : 0 et C 22 : 0 (L.E.C. = 20,5 à 21,5) (LOUGH, 1964) (COPPOCK *et al.*, 1965) (FULK et SHORB, 1970).

Le spectre de masse du pic A (α = 2,25, L.E.C. = 20,7) est analogue à ceux publiés par RYHAGE et STENHAGEN (1960), HANSEN et SMITH (1966) et MC CLOSKEY (1970) à partir de mono-methoxy-stéarates de méthyle. L'ion moléculaire M^+ = 328 n'est pas observé. On observe des pics caractéristiques à *m/e* = 296 (M — CH_3OH), 297 (M — CH_3O), 264 (M — $2CH_3OH$) et 265 (M — CH_3OH — CH_3O). Par ailleurs, ces composés se fragmentent suivant le schéma :



la présence des ions (*a*) et (*b*) a permis de localiser la fonction méthoxyde sur les carbones 8(x = 10), 9(x = 9), 10(x = 8), 11(x = 7), 12(x = 6), 13(x = 5) et 14(x = 4). Le pic A serait composé d'un mélange des 7 isomères de position (C 8 à C 14) de mono-méthoxy-stéarates de méthyle. Les pics les plus intenses sont obtenus à *m/e* = 215 (*a*), 183 (*c*), 151 (*d*) et 157 (*b*) permettant de supposer que le 10-méthoxystéarate de méthyle (x = 8) est l'isomère présent en quantité la plus abondante dans le pic A du chromatogramme.

Le spectre de masse du pic B(α = 2,45, L.E.C. = 21,0) pourrait aussi correspondre à un autre isomère de position de mono méthoxy-stéarate de méthyle. Des pics intenses sont observés à *m/e* =

264 (M — 2 CH_3OH), 265 (M — CH_3OH — CH_3O), 285 (M — C_3H_7)(*a*),
253 (285 — CH_3OH) (*c*), 221 (253 — CH_3OH) (*d*), 222 (253 — CH_3O),
87 (M — $(CH_2)_{13}$ $COOCH_3$) (*b*).

Les ions (*a*) et (*b*) permettent de localiser la fonction méthoxyde sur le carbone 15(x = 3). Il s'agirait du 15-méthoxystéarate de méthyle.

La structure que nous proposons pour le pic B demeure hypothétique, car nous n'avons pas pu comparer son comportement chromatographique ni son spectre de masse à celui d'un composé de synthèse. Cependant, PLATTNER *et al.* (1976) ont synthétisé un mélange de monométhoxystéarates de méthyle obtenus

à partir de divers acides gras polyinsaturés. Ils observent d'une part, une séparation partielle d'isomères de position de la fonction méthoxyde lorsque les acides gras ont une double liaison ω3 (acide linolénique), et d'autre part la présence de pics intenses par spectrométrie de masse à $m/e = 285$, 253 et 87 correspondant à la position de la fonction méthoxyde sur le carbone 15.

Les composés A et B sont présents dans les fractions des esters méthyliques hydrogénés ne formant pas de complexes d'inclusion avec l'urée isolées aussi bien à partir de l'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C qu'à partir de l'huile de lin oxydée à 200 °C. Ils constituent 0,20 à 0,25 p. 100 des esters totaux des huiles non fractionnés et leurs teneurs respectives (A/B) sont dans un rapport de l'ordre de 3/1. Par ailleurs, à partir de l'huile de lin oxydée à 200 °C, nous avons observé (fig. 4) la présence de pics mineurs (mal séparés lors du couplage CG — SM) qui donnent un spectre de masse où on observe un ion de faible intensité à $m/e = 326$. Cet ion pourrait correspondre à l'ion moléculaire d'un acide monocyclique hydrogéné présentant une fonction méthoxyde, analogue à celui obtenu par SAGREDOS (1969) en estérifiant les acides cycliques insaturés par chauffage dans le méthanol en présence d'un catalyseur acide (SO_4H_2). Cependant le spectre de masse que nous avons obtenu est complexe et ne correspond manifestement pas à un composé pur. Des ions sont observés à $m/e = 297$ ($326 - C_2H_5$), $294(326 - CH_3OH)$, mais le reste du spectre est complexe et ne nous a pas permis d'établir s'il s'agit réellement de composés à structure cyclique. Une autre alternative envisageable pour expliquer la présence d'un ion moléculaire à 326 pourrait être la présence d'un ester méthylique d'un acide saturé ramifié en C 20. La présence de longues chaînes d'esters ramifiés a été signalée par ARTMAN et ALEXANDER (1968) dans une huile de soja oxydée à 182 °C. Cependant, le spectre de masse, en dehors de l'ion à $m/e = 297$ ($M - C_2H_5$) ne permet pas d'en déterminer la structure. Par ailleurs, la présence additionnelle d'un ion à $m/e = 296$ pourrait être attribuée à l'ion moléculaire d'esters cyclohexaniques (où $n = 1$ et 2), correspondant aux pics 8 et 9. La structure des composés responsables du pic C demeure donc hypothétique et demanderait une confirmation.

Les méthoxydes A et B peuvent avoir été formés au cours de la préparation des esters méthyliques où nous avons chauffé à reflux les acides gras dans le méthanol en présence d'un catalyseur acide (HCl). Dans ces conditions, des acides linéaires présentant une fonction oxygénée (en particulier des acides hydroxylés) peuvent former une liaison éther (HANSEN et SMITH, 1966) (ARTMAN et ALEXANDER, 1968); des acides présentant un système de deux doubles liaisons conjuguées peuvent également former des monométhoxydes (KORITALA et ROHWEDDER, 1972); des acides monoéniques peuvent également former des méthoxydes lorsqu'ils sont estérifiés à chaud par le méthanol en présence de trifluorure de bore (LOUGH, 1964) (FULK et SCHORB, 1970). Cependant, nous ne connaissons pas l'origine exacte de ces méthoxydes obtenus dans nos conditions de travail (étherification d'une fonction oxygénée et/ou addition d'une molécule de méthanol sur une double liaison ou un système de doubles liaisons conjuguées).

Par ailleurs, l'addition de méthanol à des doubles liaisons en position semi-cyclique peut être effectuée en utilisant des catalyseurs acides (SEN GUPTA et PETERS, 1969) et pourrait expliquer la formation de certains composés responsables du pic C. Cependant, il convient de remarquer en premier lieu que la structure cyclique de ces composés n'a pu être clairement établie et demanderait une confirmation, et en deuxième lieu que la quantité calculée pour l'ensemble des composés chromatographiés avec le pic C est faible (de l'ordre de 6 p. 100 des esters cycliques hydrogénés de l'huile oxydée à 200 °C).

III. — Discussion et conclusion

L'objectif de ce travail était de doser et de caractériser par couplage en chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse les esters méthyliques hydrogénés des acides monomères à structure cyclique provenant d'huiles de lin chauffées dans des conditions différentes. BLACK et EISENHAUER (1963) avaient hydrogéné les esters provenant d'huile de lin chauffée, et proposé une méthode de détermination quantitative des monomères cycliques par chromatographie en phase gazeuse. Afin de concentrer ces produits et permettre de les caractériser dans des échantillons à teneur relativement faible, nous avons utilisé de façon complémentaire le test de complexation avec l'urée qui permet d'éliminer la plus grande partie des esters à chaîne linéaire. Par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectromètrie de masse il a été possible de séparer 9 pics. Les spectres de masse obtenus à partir de 5 de ces pics permettent de les identifier : ils correspondent à des paires d'isomères de configuration cis et trans de dérivés cyclohèxaniques α-disubstitués (FRIEDRICH, 1967) dont la formule générale est donnée sur la figure 2 (où $n = 2$, 3 et 4). Ces composés constituent la plus grande partie des acides à structure cyclique hydrogénés que nous avons caractérisés à partir de l'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C et de l'huile de lin oxydée à 200 °C. Les composés pour lesquels $n = 3$ sont les plus abondants constituent environ 50 p. 100 des esters cycliques hydrogénés de l'huile de lin thermopolymérisée, et environ 60 p. 100 des esters cycliques hydrogénés de l'huile de lin oxydée. Les deux isomères pour lesquels $n = 3$ sont ceux qui ont pu être les mieux caractérisés et identifiés par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

Ce résultat est en accord avec ceux d'autres travaux qui avaient utilisé de l'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C. MAC DONALD (1956) a isolé de l'anhydride phtalique après aromatisation et oxydation des monomères cycliques provenant d'huile de lin chauffée à 275 °C, prouvant qu'une partie au moins de ces composés présentait un cycle à 6 atomes de carbone. MC INNES *et al.* (1961) ont séparé les monomères cycliques non hydrogénés par chromatographie en phase gazeuse préparative en 3 fractions qu'ils ont caractérisées par spectrométrie infra-rouge et par l'analyse des produits obtenus après oxydation des esters par le permanganate-périodate. Ils ont conclu que ces composés avaient le même squelette carboné correspondant à la figure 2 (avec $n = 3$) et possédaient deux doubles liaisons : l'une étant localisée sur le cycle, et l'autre sur une chaîne latérale. KUSAKA et MATSUO (1972) arrivent aux mêmes conclusions en utilisant la spectrométrie infra-rouge et la chromatographie en phase gazeuse.

HUTCHISON et ALEXANDER (1963) ont isolé à partir des monomères cycliques non hydrogénés par chromatographie en phase gazeuse un composé dont le squelette carboné correspond à la figure 2 (avec $n = 1$), et qui présente une double liaison sur le cycle, et une double liaison sur la chaîne carbonée portant la fonction ester. Cependant, dans nos conditions de travail, les composés pour lesquels $n = 1$ ne seraient présents qu'à l'état de traces. Il est probable (ARTMAN 1969) que la fraction isolée par HUTCHISON et ALEXANDER (1963) correspondait à un mélange de plusieurs composés.

Récemment, SAITO et KANEDA (1976) ont utilisé un type de fractionnement plus élaboré faisant appel à diverses méthodes de séparation. Les acides monomères à structure cyclique caractérisés présentent deux doubles liaisons, mais la plupart des structures proposées diffèrent de celles proposées par MC INNES *et al.* (1961)

en ce qui concerne la position des doubles liaisons. Ces esters ont été hydrogénés puis caractérisés par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Deux constituants ont été ainsi séparés, ils ont un squelette carboné à structure cyclohexanique correspondant à la figure 2 (avec $n = 3$ et 4).

Dans le présent travail, nous avons également séparé à partir des esters hydrogénés provenant de l'huile de lin thermopolymérisée un pic qui pourrait correspondre à un composé bicyclique (dérivé disubstitué de l'hexahydroindane) analogue à l'un des composés isolés par ECKERT *et al.* (1969), SAGREDOS (1974), HASE *et al.* (1972, 1974) à partir d'huile de lin (ou de certains isomères de l'acide linolénique) chauffée dans des conditions différentes des nôtres (fig. 1, structure IVB). Ce composé constitue cependant une proportion mineure (6 p. 100) parmi les acides monomères à structure cyclique hydrogénés que nous avons caractérisés à partir de l'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C (fig. 3, pic n° 10). Par ailleurs, ce composé n'a pas été caractérisé par spectrométrie de masse dans les acides monomères à structure cyclique hydrogénés provenant de l'huile de lin oxydée à 200 °C, il ne serait pas présent (ou à l'état de traces), la surface sous le pic n° 10 (fig. 4) représentant seulement 1 p. 100 des monomères cycliques hydrogénés.

D'autre part, dans le présent travail, nous avons pu séparer par chromatographie en phase gazeuse à partir des monomères cycliques hydrogénés deux pics (n° 2 et n° 3) qui donnent des spectres de masse pouvant correspondre à la présence de composés cycliques à noyau cyclopentane bisubstitué. La possibilité de la formation de cycles à 5 atomes de carbone avait déjà été envisagée par GAST *et al.* (1963) qui avaient proposé un mécanisme de cyclisation à partir d'acides non conjugués. KUSAKA et MATSUO (1972) ont également émis l'hypothèse de la présence d'un acide gras possédant une structure cyclopenténique en se basant sur des données de spectrométrie infra-rouge. Récemment TOTANI et MATSUO (1976) ont chauffé différents esters éthyliques purifiés (linoléate, linolénate, β-éléostéarate) à 295 °C en présence de base forte et de solvant. Ils ont cherché à mettre en évidence la formation éventuelle d'esters à noyau cyclopentadiène bisubstitué en s'appuyant sur les résultats d'une réaction colorée établie avec différents modèles d'hydrocarbures monocycliques (en particulier du cyclopentadiène) ne portant pas de chaînes latérales. Dans ces conditions, la fraction des monomères cycliques provenant du linolénate d'éthyle chauffé contient des quantités non négligeables (4,1 p. 100) de composés réagissant comme le cyclopentadiène purifié vis-à-vis de la réaction colorée. Par contre, les monomères cycliques provenant des autres esters chauffés (linoléate, β-éléostéarate) ne contiendraient pas (ou des traces) de tels composés.

Dans le présent travail, nous apportons un argument additionnel (par spectrométrie de masse) à l'hypothèse de la formation de cycles à 5 atomes de carbone en plus des cycles à 6 atomes de carbone. Les acides monomères possédant un cycle à 5 atomes de carbone se formeraient à partir de l'acide linolénique (acide gras le plus abondant dans l'huile de lin) aussi bien lors de la thermopolymérisation de l'huile de lin à 275 °C, que du chauffage de l'huile de lin à 200 °C en présence d'air. Les teneurs des composés présentant un cycle à 5 atomes de carbone (aire sous les pics n° 2 et n° 3 exprimée en p. 100 de l'aire totale sous les pics n° 2 à 11) seraient respectivement de l'ordre de 33 et 25 p. 100 dans les deux huiles de lin chauffées. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif car il est probable que les pics n° 2 et n° 3 du chromatogramme ne correspondent pas à des composés purifiés.

Dans des travaux antérieurs, MICHAEL *et al.* (1966), MICHAEL (1966*a*, *b*) ARTMAN et ALEXANDER (1968), ARTMAN et SMITH (1972) ont cherché à identifier

de manière systématique les différents composés présents dans la fraction des esters monomères ne formant pas de complexes d'inclusion avec l'urée, à partir de corps gras chauffés dans des conditions thermooxydatives voisines de celles utilisées au cours d'opérations de friture profonde (chauffages réalisés en présence d'air à des températures de 200 °C et 182 °C). Ils ont séparé à partir de cette fraction de nombreux composés (136 dans le travail d'ARTMAN et SMITH). Parmi ceux-ci la plupart des acides monomères à structure cyclique qui ont pu être partiellement ou complètement caractérisées et identifiés, sont principalement des dérivés disubstitués de noyaux à 6 atomes de carbone (cyclohexane, cyclohexène, benzène). Les seuls composés comportant un noyau à 5 atomes de carbone qui ont pu être identifiés (ARTMAN et SMITH, 1972) sont des cyclopentenones monosubstituées présentes à l'état de traces et dont le nombre d'atomes de carbone (C 11 à C 14) est inférieur à celui des acides de l'huile initiale (C 18). Comme les corps gras utilisés dans ces travaux (linoléate de méthyle purifié, huile de soja partiellement hydrogénée, huile de coton) ne contenaient pas (ou des traces) d'acide linolénique, ARTMAN (1976) conclut que la fermeture de cycles à partir de chaînes oléique et linoléique se fait préférentiellement par la formation d'anneaux à 6 atomes de carbone. Cette conclusion est confirmée par les travaux de PERKINS et ANFINSEN (1971) et de WANTLAND et PERKINS (1970).

Aucun travail, à notre connaissance, n'a cherché à identifier les acides monomères à structure cyclique provenant du chauffage de chaînes grasses triéniques non conjuguées (acide linolénique) chauffées dans des conditions thermo-oxydatives, voisines de celles utilisées dans les opérations de friture profonde (température de l'ordre de 200 °C). Le présent travail montre que les esters cycliques hydrogénés obtenus dans ces conditions de chauffage à partir d'huile de lin sont, en première approximation, les mêmes que ceux isolés à partir d'huile de lin thermopolymérisée à 275 °C. Cependant, les rendements obtenus sont beaucoup plus faibles. L'huile de lin oxydée à 200 °C contient 10 fois moins de ces monomères cycliques que l'huile thermopolymérisée à 275 °C, bien que ces deux huiles soient globalement aussi dégradées. Ce résultat confirme la suggestion de ARTMAN (1969) selon laquelle les corps gras contenant des chaînes à haut degré d'insaturation ont une tendance plus prononcée à former des polymères et des produits d'oxydation plutôt qu'à subir des cyclisations intramoléculaires au cours de traitements de type thermo-oxydatif à des températures de l'ordre de 200 °C.

Récemment GENTE et GUILLAUMIN (1977) ont proposé une méthode de dosage des acides monomères à structure cyclique hydrogénés qui présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide que celle que nous utilisons dans ce travail. Cette méthode leur a permis d'étudier différentes huiles chauffées à des températures variées (220, 240 et 275 °C). Ils montrent que pour un type de chauffage donné, le pourcentage de monomères cycliques formés augmente de manière pratiquement linéaire en fonction du pourcentage d'acide linolénique des corps gras utilisés. Dans le cas des huiles ne contenant pas d'acide linolénique (arachide, tournesol, carthame) thermopolymérisées à 275 °C, ils ne mettent en évidence la présence des acides monomères à structure cyclique qu'à des très faibles teneurs (0,15 à 0,20 p. 100). Dans le cas des chauffages réalisés en présence d'air à des températures de 220 °C et 240 °C, les résultats obtenus à partir de ces huiles sont du même ordre de grandeur (0,15 à 0,30 p. 100). Comme les acides gras insaturés présents dans ces huiles sont les acides linoléique et oléique, les résultats obtenus par GENTE et GUILLAUMIN confirment l'hypothèse selon laquelle les acides monomères à structure cyclique hydrogénés identifiés dans le présent travail à partir des huiles de lin chauffées proviennent principalement de la cyclisation de l'acide linolénique, et accessoire-

ment de la cyclisation des acides linoléique et oléique. Par ailleurs, le travail de GENTE et GUILLAUMIN montre que, dans le cas des huiles contenant des quantités notables d'acide linolénique (lin, soja, colza, primor), la quantité de monomères cycliques dosés est beaucoup plus élevée lors de la thermopolymérisation à 275 °C, que lors des chauffages réalisés en présence d'air à 220 °C et 240 °C. Ce dernier résultat est en accord avec la comparaison des deux types de traitements appliqués à l'huile de lin dans le présent travail.

Les conclusions du présent travail concernant l'identification et le dosage des différents composés à structure cyclique demanderaient à être confirmées par des travaux complémentaires. Seule l'identification des composés à structure cyclohexanique (en particulier ceux pour lesquels $n = 3$) nous paraît assurée. Le comportement chromatographique et les spectres de masse obtenus pour les différentes structures proposées devraient être comparés avec ceux obtenus à partir de composés modèles préparés par synthèse chimique. Par ailleurs, une meilleure séparation pourrait être obtenue par chromatographie en phase gazeuse sur colonnes capillaires en couplage avec un spectromètre de masse.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciement

Nous remercions P. O. ASTORG qui a préparé les colonnes capillaires.

Summary

G.L.C. — M.S. Characterization of C 18 — saturated cyclic acids prepared from either thermally polymerized or thermally oxidized linseed oils.

Heated linseed oils have been prepared either by thermopolymerization at 275 °C for 12 hours under nitrogen atmosphere, or by thermal oxidation at 200 °C for 100 hours under air. Methyl esters from these two oils have been hydrogenated and fractionated by urea adduction. They give rise to at least 9 peaks as evidenced by subsequent analysis with the aid of gas liquid chromatography-mass spectrometry. Five of these have been shown to be configurational isomers of α-disubstituted cyclohexane derivatives with the following formula (I):

(I) $H(CH_2)_n — C_6H_{10} — (CH_2)_{11-n}\ COO\ CH_3$, with $n = 2$, 3 and 4.

The positional isomer with propyl side chain ($n = 3$) is predominant in both heated oils.

On the other hand, 2 other major peaks have been characterizated as being α-disubstituted cyclopentane derivatives with the following formula (II):

(II) $H(CH_2)_n — C_5H_8 — (CH_2)_{12-n}\ COO\ CH_3$, with $n = 3$ and 4

Compounds (I) and (II) have been formed in both heated oils.

From thermopolymerized linseed oil a minor peak has been separated wich could be an α-disubstituted hexahydroindane derivative with the following formula (III):

(III) $H(CH_2)_2 — C_9H_{14} — (CH_2)_6\ COO\ CH_3$

It is also suggested from the GLC-MS data that most of the GLC peaks are not reliable to pure compounds; small amounts of compounds of the formula (I) with shorter or longer alkyl side chain ($n = 1$ or $n \geqslant 4$) could also be present.

Mass spectra of compounds (I) and (III) isolated from heated oils have been already reported by previous workers, but not those of compounds (II).

Références bibliographiques

ARTMAN N. R., 1969. The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv. Lipid Res.*, **7**, 245-330.

ARTMAN N. R., 1976. (Communication personnelle.)

ARTMAN N. R. et ALEXANDER J. C., 1968. Characterization of some heated fat components. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 643-648.

ARTMAN N. R. et SMITH D., 1972. Systematic isolation and identification of minor components in heated and unheated fat. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **49**, 318-326.

BLACK L. T. et EISENHAUER R. A., 1963. Determination of cyclic fatty acids by gas-liquid chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 272-274.

CASON J. et KHODAIR A. I. A., 1967. Mass spectra of certain cycloalkylacetates and of related unsaturated esters. *J. Org. Chem.*, **32**, 575-581.

CHRISTIE W. W., REBELLO D. et HOLMAN R. T., 1969. Mass spectrometry of derivatives of cyclopentenyl fatty acids. *Lipids*, **4**, 229-231.

COENEN J. W. E., WIESKE T., CROSS R. S. et RINKE M. H., 1967. Occurence, detection and prevention of cyclisation during hydrogenation of fatty oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **44**, 344-349.

COPPOCK J. B. M., DANIELS N. W. R. et EGGITT P. W. R., 1965. Lipid oxidation in flour doughs. Observations involving the boron trifluoride interesterification reaction. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 652-656.

CRAMPTON E. W., COMMON R. H., FARMER F. A., WELLS A. F. et CRAWFORD D., 1953. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. III. The segregation of toxic and non toxic material, from the esters of heat-polymerized linseed oil by distillation and by urea adduct formation. *J. Nutr.*, **49**, 333-346.

CRAMPTON E. W., COMMON R. H., PRITCHARD E. T. et FARMER F. A., 1956. Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. IV. Ethyl esters of heat-polymerized linseed, soybean and sunflower seed oils. *J. Nutr.*, **60**, 13-24.

ECKERT W. R., SCHARMANN H. et ZEMAN A., 1969. Strukturaufklärung cyclischer Fettesäuremethylester III: Uber das Auftreten bicyclischer Fettesäuremethylester in cyclisiertem Leinöl. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **71**, 468-471.

FIGGE K., 1971. Dimeric fatty acid (1 — ^{14}C) methyl esters. I. Mechanisms and products of thermal and oxidative-thermal reactions of unsaturated fatty acids esters. Litterature review. *Chem. Phys. Lipids*, **6**, 164-182.

FIRESTONE D., 1963. The determination of polymers in fats and oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 247-255.

FIRESTONE D., NESHEIM S. et HORWITZ W., 1961. Heated fats. III. Determination of urea filtrates. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, **44**, 465-474.

FRIEDRICH J. P., 1967. C 18 — saturated cyclic acids from linseed oil: A structural study. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **44**, 244-248.

FULK W. K. et SCHORB M. S., 1970. Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, **11**, 276-277.

GAST L. E., SCHNEIDER W. J., FOREST C. A. et COWAN J. C., 1963. Composition of methyl esters from heat-bodied linseed oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 287-289.

GENTE M. et GUILLAUMIN R., 1977. Dosage des monomères cycliques. *Rev. Fr. Corps Gras*, **24**, 211-218.

GUILLAUMIN R., 1969. Composés non volatils formés lors des fritures. I et II. *Rev. Fr. Corps Gras*, **16**, 119-124 et 189-204.

GUILLAUMIN R., 1971. Modifications d'ordre chimique intervenant lors du chauffage des corps gras. *Rev. Fr. Corps Gras*, **18**, 445-456.

HANSEN R. P. et SMITH J. F., 1966. The occurence of methyl methoxystearate isomers in the methylesters prepared from sheep perinephric fat. *Lipids*, **1**, 316-321.

HASE A., HARVA O. et JAAKKOLA V., 1972. Cyclic fatty acids in tall oil. *Kemian Teollisuus*, **29**, 885-890.

HASE A., HARVA O. et PAKKANEN T., 1974. Origin of bicyclic fatty acids in tall oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **51**, 181-183.

HUTCHISON R. B. et ALEXANDER J. C., 1963. The structure of a C 18 acid from heated linseed oil. *J. Organ. Chem.*, **28**, 2522-2526.

KORITALA S. et ROHWEDDER W. K., 1972. Formation of an artifact during methylation of conjugated fatty acids. *Lipids*, **7**, 274.

KUSAKA H. et MATSUO N., 1972. Gas chromatographic studies of C 18 cyclic acid esters. *American oil chemists society — Japan oil chemist society, 23-26 Avril Joint Meeting*, Los Angeles (U.S.A.).

KUSAKA H. et MATSUO N., 1976. Studies of cyclic compounds separated from heated oils and fats. IV. Cyclohexyl compounds in the cyclic monomer fraction obtained from heated methyl β-eleostearate. *Yukagaku*, **25**, 553-556.

LOUGH A. K., 1964. The production of methoxy-substituted fatty acids as artifacts during the esterification of unsaturated fatty acids with methanol containing boron trifluoride. *Biochem. J.*, **90**, 4 c-5 c.

MAC DONALD J. A., 1956. Evidence for cyclic monomers in heated linseed oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **33**, 394-396.

MATSUO N., 1962. Nutritional effects of oxidized and thermally polymerized fish oils in Lipids and their oxidation, SCHULTZ H. W. édit., The Avi Publ. C°, p. 336-351.

MIKUSCH J. D. et SAGREDOS A. N., 1971. Zur Chemie der cyclischen Fettsäuren. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **73**, 384-393.

MINNIKIN D. E., ABLEY P., Mc QUILLIN F. J., KUSAMRAN K., MASKENS K. et POLGAR N., 1974. Location of double bonds in long chain esters by methoxymercuration — demercuration follow-et by mass spectroscopy. *Lipids*, **9**, 135-140.

Mc CLOSKEY, 1970. *Mass spectrometry of fatty acid derivatives in Topics in Lipid chemistry.* GUNSTONE édit. Logos Press, Vol. 1, p. 400-401.

Mc INNES A. G., COOPER F. P. et MAC DONALD J. A., 1961. Further evidence for cyclic monomers in heated linseed oil. *Canad. J. Chem.*, **39**, 1906-1914.

MICHAEL W. R., ALEXANDER J. C. et ARTMAN N. R., 1966. Thermal reactions of methyl linoleate. I. Heating conditions, isolation techniques, biological studies and chemical changes. *Lipids*, **1**, 353-358.

MICHAEL W. R., 1966 (*a*). Thermal reactions of methyl linoleate. II. The structure of aromatic C 18 methyl esters. *Lipids*, **1**, 359-364.

MICHAEL W. R., 1966 (*b*). Thermal reactions of methyl linoleate. III. Characterization of C 18 cyclic esters. *Lipids*, **1**, 365-368.

MIKUSCH J. D. et SAGREDOS A. N., 1971. Zur Chemie der cyclischen Fettsäuren. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **73**, 384-393.

PERKINS E. G. et ANFINSEN J. R., 1971. Characterization of the non volatile compounds formed during the thermal oxidation of triolein. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **48**, 556-562.

PERKINS E. G. et IWAOKA W. T., 1973. Purification of cyclic fatty acid esters: a GC-MS study. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **50**, 44-49.

PERKINS E. G., 1976. Chemical, nutritional and metabolic studies of heated fats. I Chemical aspects. *Rev. Fr. Corps Gras*, **23**, 257-262.

PLATTNER R. D., SPENCER G. F. et KLEIMAN R., 1976. Double bond location in polyenic fatty esters through partial oxymercuration. *Lipids*, **11**, 222-227.

POTTEAU B., LHUISSIER M., LECLERC J., CUSTOT F., MEZONNET R. et CLUZAN R., 1970. Recherches sur la composition et les effets physiologiques de l'huile de soja chauffée et de différentes fractions obtenues à partir de cette huile. *Rev. Fr. Corps Gras*, **17**, 143-153 et 235-245.

RYHAGE R. et STENHAGEN E., 1960. Mass spectrometric studies. VI. Methyl esters of normal chain oxo-, hydroxy-, methoxy- and epoxy acids. *Arkiv. Kemi*, **15**, 545-574.

SAGREDOS A. N., 1969. Nachweis und Bestimmung von cyclischen C 18-Fettsäuren in isomerisiertem Leinöl. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **71**, 863-869.

SAGREDOS A. N., 1974. Zur Bildung von Indanyl-Derivaten aus Triencarbonsäuren. *Fette Seifen-Anstrichmittel*, **76**, 8-16.

SAGREDOS A. N. et MIKUSCH J. D., 1970. Zur Struktur der cyclischen Fettsäuren aus der thermischen cycliesierung von α-und β-Elaeostearinsäure methylester. *Tetrahedron*, **26**, 5587-5591.

SAITO M. et KANEDA T., 1976. Studies on the relationship between the nutritive value and the structure of polymerized oils. X. Structures and toxicity of heat-polymerized oils. 1. *Yukagaku*, **25**, 79-86.

SCHOGT J. C. M. et BEGEMAN P. H., 1965. Isolation of 11-cyclohexyl undecanoic acid from butter. *J. Lipid Res.*, **6**, 466-470.

SEN GUPTA A. K. et PETERS H., 1969. Synthesis and properties of some new C 15 — ω alicyclic and acyclic acids. *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 371-385.

TOTANI N. et MATSUO N., 1976. Studies of structural changes of unsaturated fatty acid by heating. III. Quantitative analysis of cyclopentadiene compounds. *Yukagaku*, **25**, 457-462.

UCCIANI E., 1974. Modifications de structure des corps gras. A. Modifications affectant la chaîne grasse. *Rev. Fr. Corps Gras*, **21**, 25-33.

WANTLAND L. R. et PERKINS E. G., 1970. Characterization of the non volatile compounds formed during the thermal oxidation of 1-linoleyl-2,3-distearin: II. The acidic fraction. *Lipids*, **5**, 191-200.

ZEMAN A. et SCHARMANN H., 1973. Massenspektrometrie von Lipiden (eine Zusammenfassung). II. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **75**, 32-44.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 681-693.

Modulation et influence du rejet d'eaux résiduaires d'une distillerie vinicole sur une station d'épuration urbaine

A. BORIES et J. MAUGENET

avec la collaboration technique de J. RAYNAL et M. L. DALMEYDA

Station d'Oenologie et de Technologie végétale, I.N.R.A.,
** Centre de Recherches de Toulouse*
11104 Narbonne Cedex

Résumé

L'harmonisation du traitement mixte d'épuration d'eaux domestiques et d'eaux résiduaires de distilleries vinicoles a été définie sur une station communale fonctionnant à capacité maximale. L'analyse de l'oxygénation de cette installation a mis en évidence une période nocturne susceptible de recevoir un apport polluant. La modulation du rejet a été établie d'après la quantité d'oxygène disponible et les besoins en oxygène.

Une charge polluante supplémentaire représentant environ 25 p. 100 de la capacité habituellement traitée, déversée pendant la période nocturne, n'a perturbé ni l'efficacité de l'épuration, ni la qualité du rejet. Le rendement d'épuration de la vinasse est voisin de 85 p. 100.

Mots-clés : *Eaux résiduaires — Distilleries vinicoles — Traitement mixte — Épuration biologique — Station d'épuration urbaine.*

Introduction

Le traitement mixte d'épuration d'effluents domestiques et d'eaux résiduaires d'industries agricoles et alimentaires présente un double intérêt. Économiquement il est justifié par l'activité saisonnière de la plupart de ces industries, par un investissement et un coût de fonctionnement moins lourds pour l'industrie. Sur le plan technique, le mélange d'une eau résiduaire industrielle souvent déficitaire en nutriments et d'une eau domestique riche en ces éléments peut concourir à une plus grande efficacité du traitement. La réglementation française en vigueur et certaines conditions financières et techniques ont été décrites par DEFOUG (1973).

Face à ces avantages quelques contraintes inhérentes aux caractéristiques de ces industries apparaissent. L'irrégularité des périodes de rejets s'avère néfaste

à un traitement biologique. La charge polluante très élevée de ces eaux, notamment pour les distilleries vinicoles (MOURGUES et MAUGENET, 1969; RAMBAUD et BONTOUX, 1974; REBOUL 1976; BORIES, 1977) et l'implantation souvent rurale des industries agro-alimentaires constituent une disproportion difficilement acceptable par un ouvrage d'épuration. Ainsi les eaux résiduaires de distilleries vinicoles (vinasses) ont une charge organique soluble de 200 à 400 équivalent-habitant (E.H.) par m^3. Parmi les producteurs d'alcool de régie, 65 p. 100 des établissements ont une capacité inférieure à 3 000 hl d'alcool pur par an (REBOUL, 1976). Leur potentiel de pollution représente environ 5 000 à 15 000 équivalent-habitant par journée de distillation.

Le traitement mixte nécessitera donc un stockage et un étalement des rejets afin de respecter les charges admissibles par l'installation. La situation la plus délicate et la plus répandue concerne les stations d'épuration déjà implantées, conçues uniquement pour l'effluent urbain. Envisager dans ce cas un apport supplémentaire de pollution nécessite une modulation précise du rejet en vue d'harmoniser les flux polluants respectifs.

Cet aspect du traitement mixte a constitué l'objet de notre étude. Elle a eu pour cadre une station d'épuration communale utilisée à sa pleine capacité et une distillerie procédant au traitement de marcs par diffusion et recyclage des vinasses de piquettes.

Une étude détaillée de l'oxygénation a permis de définir les modalités de rejets. Puis, l'influence du rejet de vinasses sur l'efficacité du traitement et la qualité de l'effluent a été examinée sur une période de plus d'un mois.

Matériel et méthodes

L'effluent urbain épuré issu du clarificateur secondaire a été prélevé manuellement à plusieurs moments de la journée (8 h, 11 h, 17 h). Celui-ci, filtré, a subi les analyses décrites ci-après.

La vinasse de piquette recyclée a été analysée après une centrifugation de 10 min. à 10 000 g.

Les analyses pratiquées sur ces effluents ont consisté en la mesure de :

— la demande biochimique en oxygène en 5 jours (DBO_5) selon la norme AFNOR T 90 103 (mg $O_2.l^{-1}$);
— la demande chimique en oxygène (DCO) : norme AFNOR T 90 101 (mg $O_2.l^{-1}$);
— le carbone organique total (COT) : par combustion par voie sèche (analyseur DORHMANN DC 50, TAKAHASHI *et al.*, 1972) exprimé en mg $C.l^{-1}$;
— le phosphore total : méthode de FISKE et SUBBAROW (LOISELEUR, 1963), mg $P.l^{-1}$;
— le potassium, dosé par spectrophotométrie de flamme (mg $K.l^{-1}$);
— sulfates : méthode par néphélométrie (RODIER, 1975) (mg $SO_4^{2-}.l^{-1}$);
— l'azote total : méthode selon KJELDAHL (mg $N.l^{-1}$);
— l'oxygène dissous par un analyseur BECKMAN (modèle 777) équipé d'une sonde polarographique et d'un enregistreur. Les résultats sont exprimés en mg $O_2.l^{-1}$;
— les matières en suspension (MES) déterminées après centrifugation de 10 min à 10 000 g puis séchage du culot à 105 °C pendant 12 h.

Étude du fonctionnement de la station d'épuration

La station d'épuration a été conçue pour une population de 2 000 habitants. Actuellement le nombre d'habitants raccordés au réseau d'assainissement est de 1 842.

L'ouvrage est composé d'un bassin d'aération d'un volume utile de 300 m^3 équipé d'un aérateur de surface de puissance 7,5 KW dont la capacité d'oxygénation standard est de 12,5 kg $O_2.h^{-1}$ selon le cahier des charges. La programmation du temps de fonctionnement du système d'aération est assurée par une minuterie à cycle de 30 min. Celle-ci n'offre pas la possibilité de moduler automatiquement le cycle au cours de la journée.

Un clarificateur de 70 m^3 succède au bassin d'aération.

Les caractéristiques de fonctionnement sont rassemblées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Paramètres de fonctionnement de la station urbaine (d'après les données de DDA 1975)

Population	1 842 hab.
Volume d'effluent	276 $m^3.j.^{-1}$
Débit maximum	18 $m^3.h^{-1}$
Débit minimum	3,5 $m^3.h^{-1}$
Charges appliquées :	
DBO ad2	89,5 kg O_2
DCO ad2	178 kg O_2
Volume bassin d'aération	300 m^3
Puissance de l'aérateur	7,5 KW
Volume du clarificateur secondaire	70 m^3
Charge volumique	0,59 kg DCO.$m^{3-1}.j^{-1}$
Charge massique	0,29 kg DCO.kg^{-1} MES.j^{-1}

L'efficacité du traitement biologique s'avère satisfaisante quant aux matières organiques solubles; le rejet est conforme aux normes imposées : DBO = 10 mg $O_2.l^{-1}$. En ce qui concerne les matières en suspension on note une mauvaise décantation des boues à l'origine de leur entraînement par l'effluent secondaire. L'examen microscopique de la flore révèle la prolifération de bactéries filamenteuses induisant le bulking. Cet état semble persister depuis plusieurs mois.

Parmi les causes de ce phénomène, PIPES (1967), RIDEAU et MORFAUX (1975) évoquent la limitation de l'oxygène dissous. L'étude du profil de l'oxygène dans le bassin d'aération (fig. 1) met en évidence une déficience de cet élément aux périodes d'arrivée massive du flux polluant (6 h-23 h). La teneur en oxygène est inférieure à 1 mg l^{-1}, seuil critique pour un métabolisme aérobie (WUHRMANN,

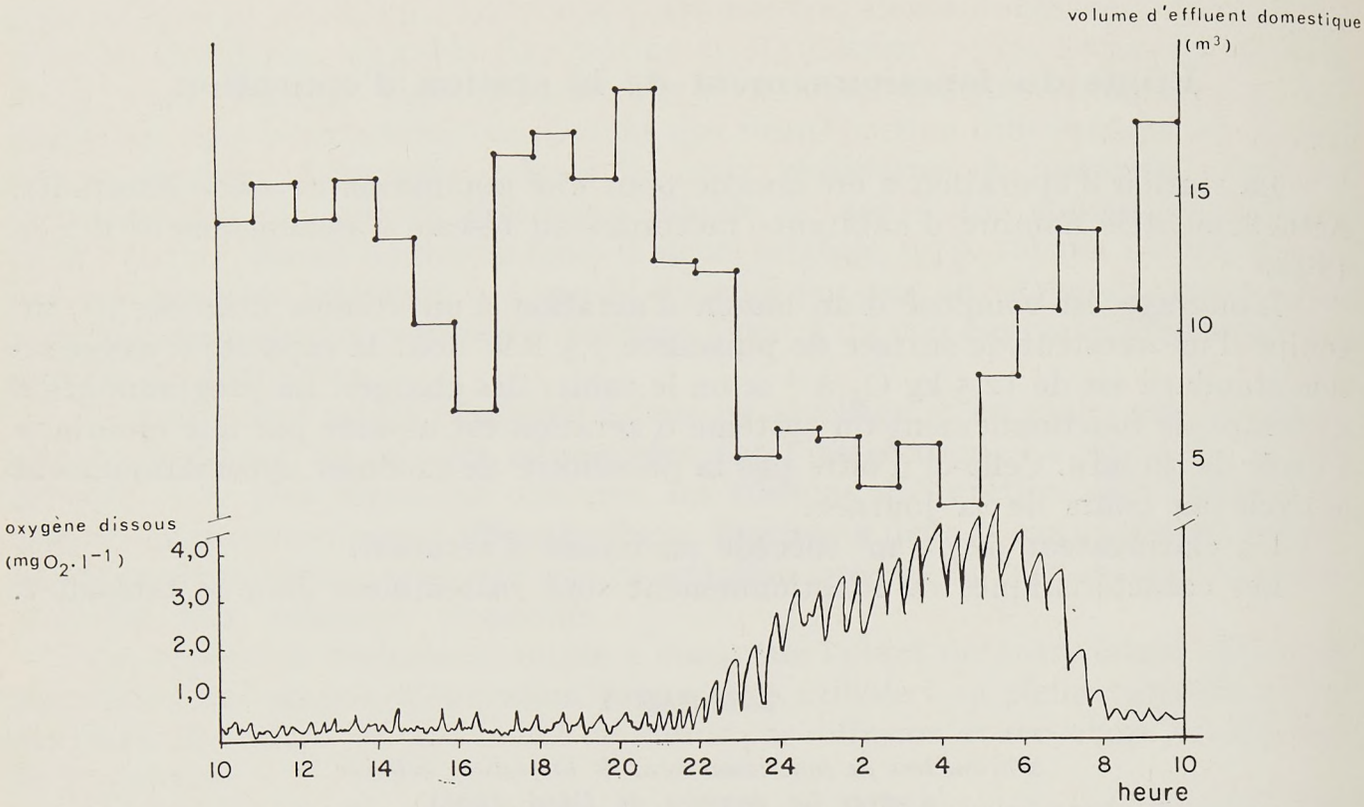


FIG. 1. — *Volume d'effluent domestique reçu par la station (DDA, 1975)* (●——●) *et profil de la teneur en oxygène dissous* (——) *au cours d'un cycle de 24 h.*

1964; BOUTIN *et al.*, 1975; STUKENBER *et al.*, 1977). Par contre, la période nocturne (23 h-6 h), où les apports sont les plus réduits, est caractérisée par un niveau d'oxygénation élevé. La mauvaise répartition de l'oxygène est favorable au développement de bactéries filamenteuses.

D'autre part, la faible teneur en oxygène dissous suggère un rendement défectueux du système d'aération, vu la puissance installée. Aussi a-t-on déterminé la capacité d'oxygénation réelle du couple aérateur-bassin. La méthode retenue (BOUTIN *et al.*, 1975) permet la mesure *in situ* du coefficient de transfert de l'oxygène (Kla). Elle consiste lors de la réaération des boues activées à établir la vitesse de dissolution de l'oxygène. La consommation d'oxygène par les boues est indépendante du transfert d'oxygène et n'intervient pas sur ce facteur. Le tableau 2

TABLEAU 2

Détermination des paramètres d'oxygénation de la station d'épuration communale

Coefficient de transfert de l'oxygène en eau usée (Kla)	2,02 h^{-1}
Saturation en oxygène de l'eau usée épurée	8,4 $mg.l^{-1}$
Coefficient de saturation de l'eau usée par rapport à l'eau propre (β)	0,93
Rapport entre coefficient de transfert en eau usée et eau propre (α)	0,76
Capacité d'oxygénation en eau usée	5,2 kg $O_2.h^{-1}$
Capacité d'oxygénation en eau propre	7,0 kg $O_2.h^{-1}$
Apport spécifique nominal	0,93 kg $O_2.KW^{-1}$

résume l'ensemble des déterminations effectuées dans le cadre de la mesure de la capacité d'oxygénation.

La capacité d'oxygénation s'avère bien inférieure à celle mentionnée dans le cahier des charges. Cette déficience est à l'origine de la limitation de l'oxygène dissous en période d'arrivée du flux polluant. Cet état est souvent dû à une extrapolation sommaire d'un appareil à un autre. Le coefficient de transfert Kla est spécifique du couple aérateur-bassin et toute modification d'un des éléments est susceptible de le modifier et de se répercuter sur l'efficacité de l'oxygénation. Ces considérations sont souvent sous-estimées dans les conceptions d'ouvrages d'épuration.

Possibilités de traitement mixte

L'analyse des caractéristiques de l'oxygénation du système d'épuration souligne l'impossibilité d'un apport supplémentaire de pollution pendant la période d'arrivée intense du flux polluant urbain sous peine d'accroître le déficit d'oxygène et de compromettre l'efficacité globale du traitement.

Par contre la période nocturne caractérisée par un niveau d'oxygénation élevé est susceptible de recevoir une charge polluante. Cette observation nous a conduit à définir la capacité de traitement pour cette période par la détermination de la quantité d'oxygène disponible et du besoin en oxygène pour la dégradation de la charge organique.

La quantité d'oxygène disponible, transférée dans un milieu où se produit une consommation biologique d'oxygène est définie par la relation :

$$N = Kla(Ci - Cm)V \tag{1}$$

N = quantité d'oxygène transférée/unité de temps.
Kla = coefficient de transfert d'oxygène (temps^{-1}).
Ci = teneur en oxygène dissous dans le bassin d'aération en régime transitoire.
Cm = seuil en oxygène que l'on désire maintenir.
V = volume de liquide dans le bassin d'aération.

Le terme (Ci-Cm) appelé coefficient de facilité constitue la variable de l'équation. C'est l'amplitude entre le niveau d'oxygène en régime transitoire et celui que l'on désire garantir qui conditionne la quantité d'oxygène transférée. Dans notre cas, Ci a la valeur de l'oxygène dissous relevée pendant la phase étudiée (fig. 1), Cm est fixé à 1 mg $O_2.l^{-1}$. Pour la période 23 h-6 h la quantité disponible est évaluée à 10 kg O_2.

Cette quantité d'oxygène utilisable est à prendre en compte pour la seule dégradation de la matière organique à l'exclusion de la consommation d'oxygène des boues par respiration endogène. En effet, la teneur en oxygène Ci retenue résulte de l'activité respiratoire des boues notée pendant la période nocturne (alimentation très réduite).

Le second paramètre à définir est le coefficient d'utilisation de l'oxygène par unité de matière organique dégradée. Il est déduit de la formule générale des besoins en oxygène :

$$qO_2 = a'Le + b'S \tag{2}$$

$$a' = \frac{qO_2 - b'S}{Le} \tag{3}$$

où qO_2 = quantité d'oxygène utilisée pour la dégradation de la charge organique et la respiration des boues.
a' = coefficient d'utilisation de l'oxygène pour la dégradation de la charge polluante.
Le = quantité de charge polluante dégradée.
b' = coefficient de consommation d'oxygène par respiration endogène des boues.
S = masse de boues activées dans le bassin d'aération.

La détermination des paramètres qO_2, a', b', S effectuée lors de la mesure *in situ* du coefficient de transfert indique les valeurs suivantes :

$$qO_2 = 100 \text{ kg } O_2.j^{-1}$$
$$b' = 0{,}050 \text{ kg } O_2.\text{kg}^{-1} \text{ MES}$$
$$S = 750 \text{ kg MES}$$

La quantité de charge polluante dégradée a été mesurée par la Direction Départementale de l'Agriculture de l'Aude au cours d'une campagne de contrôle l'année précédente. Elle est chiffrée à : Le = 147 kg de DBO.j^{-1}.

Le calcul du coefficient indique a' = 0,44 kg O_2.kg^{-1} DBO_5. Cette valeur est comparable à celles généralement mentionnées dans la littérature (ECKENFELDER, 1966; BROUZES, 1973). Cet auteur fait apparaître ce coefficient sous le terme : (us).

En considérant la quantité d'oxygène disponible (10 kg O_2) on déduit une possibilité de traitement pendant la phase nocturne (23 h-6 h) de 22 kg de DBO_5.

Caractéristiques des eaux résiduaires de la distillerie Modalités de leur rejet sur le réseau urbain

La distillerie concernée traite uniquement les marcs par diffusion en procédant au recyclage des vinasses de piquettes en tête de diffusion (MOURGUES et MAUGENET, 1970).

Dès la fin de la campagne de distillation, les vinasses de piquettes recyclées ont été stockées en vue du rejet étalé sur le réseau urbain. Afin d'éviter le développement d'odeurs, une addition de persulfate d'ammonium (2 g.l^{-1}) a été effectuée (ZUMBRUNN, 1973; MAUGENET *et al.*, 1977). La composition organique et minérale des vinasses avant et après stockage est mentionnée dans le tableau 3.

Le traitement par le persulfate d'ammonium accroît la teneur en sulfates et azote total de la vinasse. Pour ce dernier élément c'est un effet bénéfique puisqu'il permet d'ajuster la composition élémentaire de la vinasse, caractérisée par un rapport DBO_5/N = 100/2,5, à une valeur DBO_5/N = 100/8, compatible à une épuration par voie biologique.

Le contenu organique des vinasses représenté principalement par du glycérol, des acides organiques, des polysaccharides et colloïdes est essentiellement biodégradable mis à part les composés polyphénoliques (MOURGUES et MAUGENET, 1969; BORIES, 1977). Les besoins en oxygène pour la dégradation de la charge organique de ces vinasses, déterminés au cours d'essais de laboratoire indiquent des valeurs de 0,6 à 2 kg O_2.kg^{-1} COT éliminé (forte ou faible charge), comparables à celles trouvées pour des eaux urbaines ou industrielles. Le coefficient de consom-

TABLEAU 3

Composition de la vinasse de piquette recyclée et influence de l'addition de persulfate d'ammonium

	Vinasse de piquette recyclée	Vinasse traitée au persulfate d'ammonium et stockée 2 mois
pH	5,1	5,0
DCO (mg $O_2.l^{-1}$)	10 314	10 144
DBO_5 (mg $O_2.l^{-1}$)	5 215	4 996
COT (mg $C.l^{-1}$)	—	2 940
Azote total (mg $N.l^{-1}$)	131	407
Phosphore total (mg $P.l^{-1}$)	41	63
Potassium (mg $K.l^{-1}$)	—	1 260
Sulfates (mg $SO_4.l^{-1}$)	305	1 084
MEST ($g.l^{-1}$)	0,342	0,668

mation d'oxygène par unité de charge polluante assimilée (*a'*) ayant pour valeur 0,43 kg $O_2.kg^{-1}$ DBO_5 ou 0,65 kg $O_2.kg^{-1}$ COT.

Les prévisions du rejet de vinasses établies sur la quantité de DBO_5 précédemment définie, que la station est susceptible d'absorber, se chiffrent à un volume journalier de 4,0 à 4,5 m^3 de vinasses, déversé pendant la période nocturne 23 h 30-6 h.

Influence de l'apport de vinasses

Le rejet des vinasses stockées a été étalé sur 36 jours consécutifs, soit un volume moyen journalier de 4,5 m^3 réparti entre 23 h 30 et 6 h. Diverses charges ont été appliquées (3,0 à 7 m^3). Le tableau 4 mentionne les parts respectives des flux polluants (commune-distillerie) reçus par la station pendant cette expérimentation.

L'évolution de la composition de l'effluent secondaire : DBO_5, DCO, COT (fig. 2), azote total et phosphore (fig. 3), potassium et sulfate (fig. 4) a été suivie tout au long de la période de traitement par prélèvements quotidiens.

Le profil de l'oxygène dissous au cours d'un cycle de traitement mixte a été dressé et comparé à celui établi lors du fonctionnement normal (fig. 5).

Le tableau 5 résume la composition moyenne de l'effluent secondaire avant et pendant cette étude. Il fait apparaître aussi la contribution de la vinasse à la charge organique globale de l'effluent, si aucune dégradation de la vinasse n'était enregistrée (effet de dilution).

Sur l'ensemble de l'expérimentation l'apport moyen journalier représentant une charge polluante supplémentaire d'environ 25 p. 100 de celle habituellement traitée, n'a pas perturbé l'efficacité du traitement (tabl. 4 et 5). L'estimation des possibilités établie d'après l'analyse de l'oxygénation de la station s'avère donc exacte.

L'harmonisation de l'apport des charges polluantes se traduit par une uniformisation du profil de l'oxygène dissous (fig. 5). Dès le rejet de vinasse (23 h 30) la chute de la teneur en oxygène suggère un début de dégradation des matières

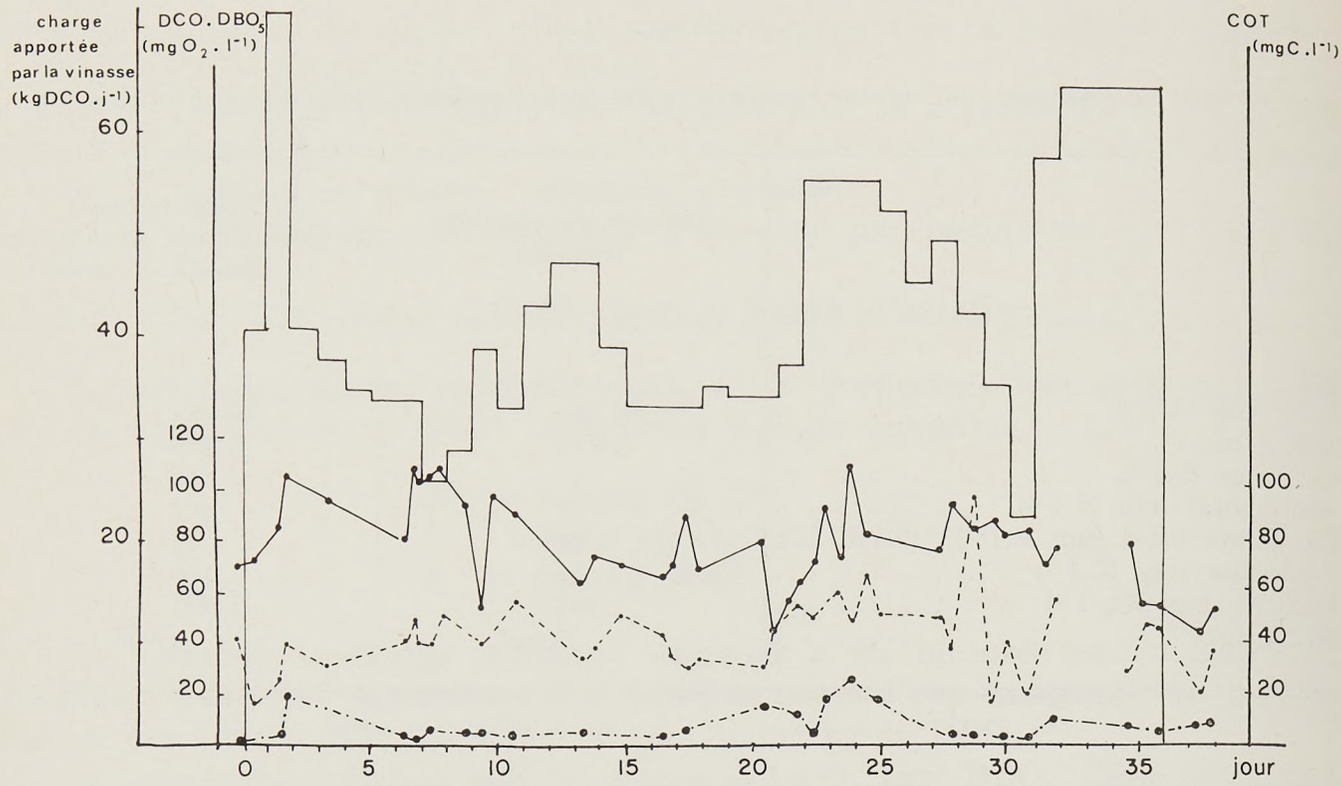


FIG. 2. — *Évolution de la charge organique de l'effluent secondaire (DCO : ●——●, DBO : ●-·-·-·-●, COT : ●- - - - -●) au cours du traitement mixte de vinasse.*

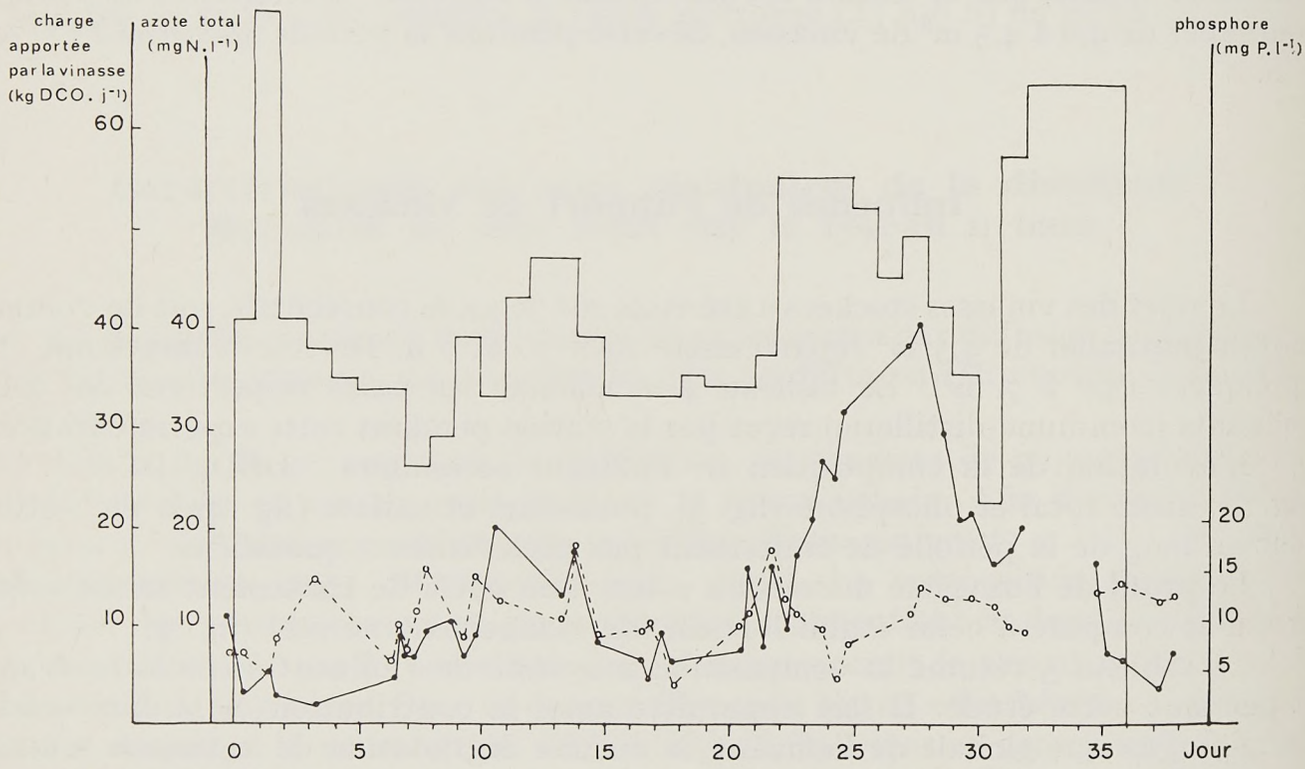


FIG. 3. — *Évolution de la teneur en azote total (●——●) et phosphore (○- - - - -○) de l'effluent secondaire au cours du traitement mixte de vinasse.*

organiques de la vinasse. Pendant la période de rejet la teneur en oxygène dissous est maintenue à des valeurs oscillant autour de 1 mg.l^{-1}. Puis dès l'arrêt du rejet (6 h) sa légère augmentation indique une métabolisation avancée de la charge organique.

Pour des flux polluants compatibles avec la capacité définie (40-45 kg DCO)

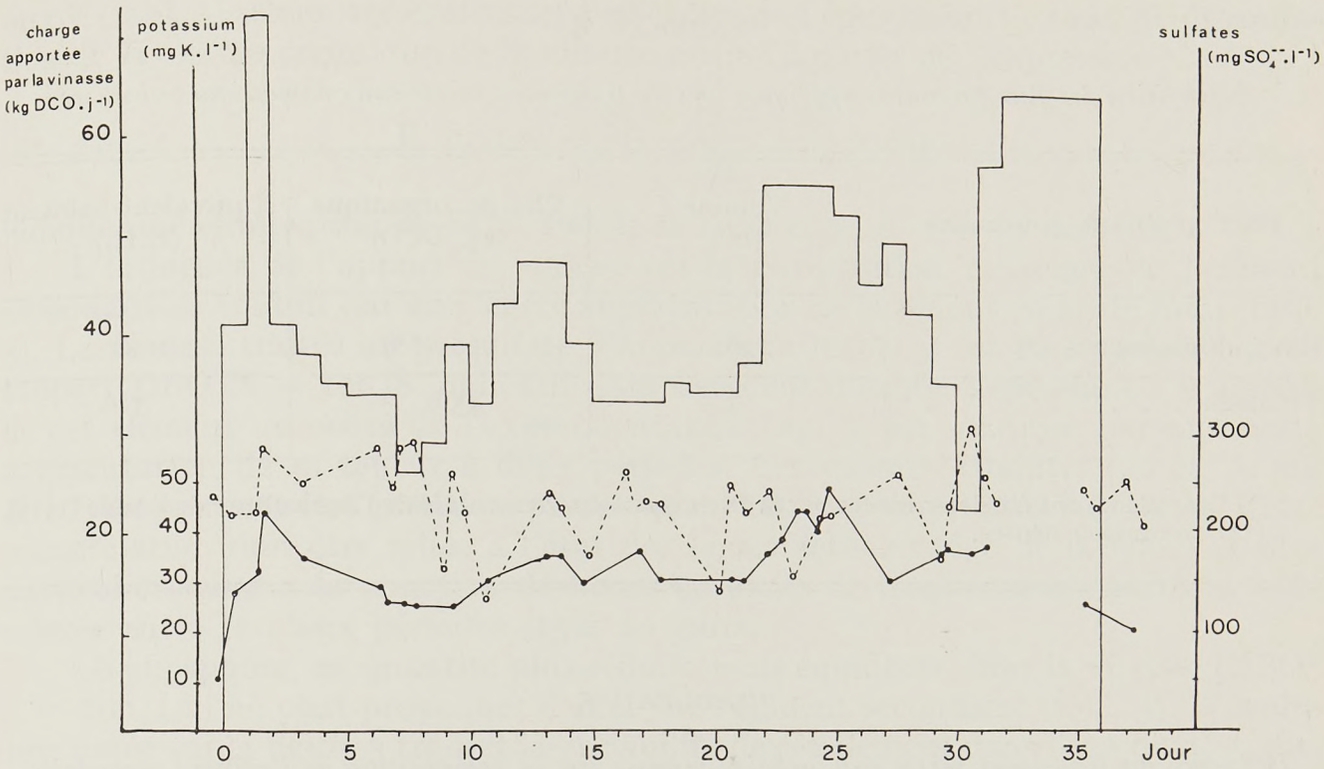


FIG. 4. — *Évolution de la composition minérale (potassium : ●——●, sulfates : o- - - - - o) de l'effluent secondaire au cours du traitement mixte de vinasse.*

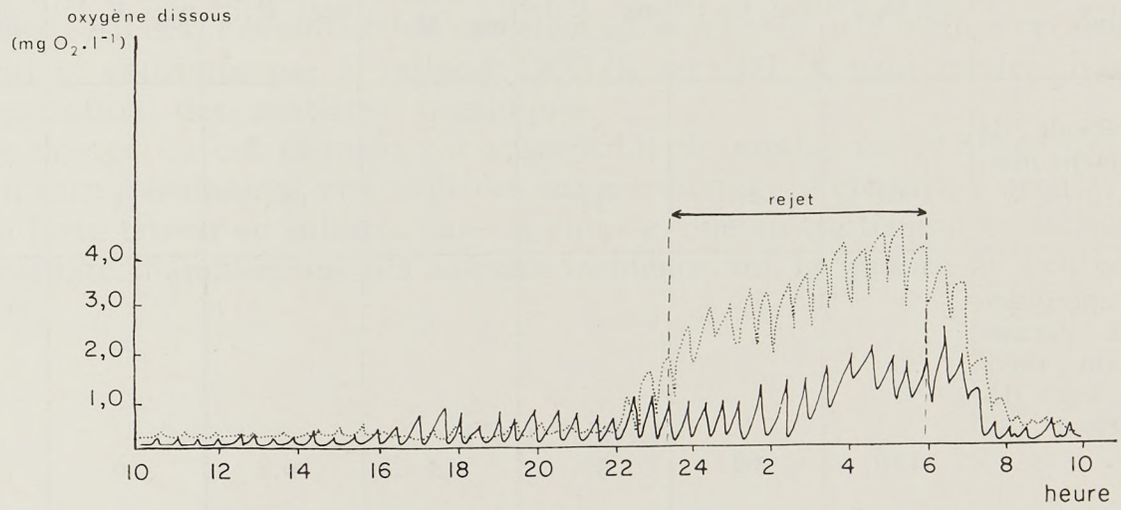


FIG. 5. — *Influence du rejet nocturne de vinasse sur la teneur en oxygène dissous (- ——) dans le bassin d'aération*
(. . . . .) : oxygène dissous lors du fonctionnement normal.

la qualité de l'effluent secondaire n'est pas modifiée en regard de celle notée hors période de traitement mixte et s'avère conforme aux normes de rejets imposées (tabl. 5 et fig. 2). Aux périodes de rejets plus élevés (60 à 70 kg DCO), la charge résiduelle (DCO) atteint des valeurs supérieures à 90 mg $O_2.l^{-1}$; la DBO_5 étant toujours inférieure au seuil de 30 mg $O_2.l^{-1}$ (fig. 2).

La comparaison de l'évolution de la DCO et du COT de l'effluent secondaire par analyse de la covariance (recherche de régression linéaire) n'a pas abouti à l'obtention de corrélation étroite entre ces deux paramètres.

L'examen du rapport DCO/COT d'une eau résiduaire avant et après épuration permet d'apprécier le niveau de dégradation de son contenu organique (FORD, 1968; MORFAUX *et al.*, 1972; BORIES, 1977). Dans ce travail il revêt l'intérêt de

TABLEAU 4

Répartition des flux polluants appliqués lors du traitement mixte eaux domestiques-vinasses

Flux polluant journalier	Volume (m^3)	Charge organique (kg DCO)	Équivalent-habitant (E.H.)
Eaux domestiques (*)	276	178 (**)	2 000
Vinasses	4,5	45,6	526

(*) Ces valeurs ont été déterminées par la Direction Départementale de l'Agriculture de l'Aude (1975).
(**) Décanté 2 heures.

TABLEAU 5

Influence du traitement mixte eau urbaine-vinasse sur la composition de l'effluent secondaire

Caractère de l'effluent secondaire	DCO mg $O_2.l^{-1}$	DBO mg $O_2.l^{-1}$	COT mg $C.l^{-1}$	Azote total mg $N.l^{-1}$	Phosphore mg $P.l^{-1}$	Potassium mg $K.l^{-1}$	Sulfates mg.l^{-1}
Hors période de traitement mixte (S_1)	61	10	32	5	10	15	220
Apport spécifique de la vinasse (dilution théorique, sans dégradation) (S_2) (*)	126	62	37	5	0,8	16	14
Effluent au cours du traitement mixte (S_3) . .	80	8	42	13	10	33	228

(*) S_2 : dilution théorique de la vinasse (4,5 m^3) dans le volume d'eau de l'installation (370 m^3) soit $\frac{1}{82}$

mettre en évidence la dégradation effective de la vinasse qui peut être masquée par l'effet de dilution. En effet, la vinasse subit une dilution d'environ 80 fois. Alors que la vinasse est affectée d'un rapport DCO/COT = 3,40, l'effluent secondaire tant au cours du traitement mixte que hors période est pourvu d'une valeur DCO/COT = 1,90 caractéristique d'effluents épurés (Bories, 1976).

Le bilan des charges admises et des charges rejetées avec et sans traitement

mixte (tabl. 5) démontre également l'efficacité de l'épuration. Le taux de dégradation de la charge organique de la vinasse estimé à partir de l'expression :

$$R \text{ p. } 100 = \frac{S_2 - (S_3 - S_1)}{S_2} \times 100 \quad (4)$$

indique une élimination de 85 p. 100 de la DCO et 73 p. 100 du carbone.

L'influence de l'apport de vinasse sur la composition moyenne de l'effluent secondaire se traduit par une légère augmentation de la teneur en azote total (tabl. 5). La vinasse traitée au persulfate d'ammonium (tabl. 3) est caractérisée par un rapport DBO/N = 100/8, indicatif d'un excédent d'azote. Cependant l'évolution de cet élément au cours de l'expérimentation (fig. 3) est marquée par une nette augmentation de sa teneur à deux périodes. Les valeurs atteintes (20 et 40 mg $N.l^{-1}$) ne peuvent être justifiées par les quantités contenues dans la vinasse. Cette accumulation doit être reliée à l'état des boues activées (âge de la boue) et plus particulièrement à la ponction de boues en excès de fréquence semblable à celle relevée entre les deux périodes (15 à 20 jours).

Le phosphore, en quantité plus réduite mais équilibrée dans la vinasse (DBO/P = 100/1,2) ne peut provoquer d'effet sur l'effluent secondaire (tabl. 5). L'évolution notée sur la figure 3 traduit la variabilité de cet élément dans l'eau domestique.

Le potassium, élément minéral dominant des eaux résiduaires viti-vinicoles peut jouer le rôle de marqueur; la faible teneur de l'eau domestique n'en est que plus favorable (tabl. 5). Malgré la dilution, sa teneur est suffisante pour observer une évolution liée au rejet de vinasses (fig. 4). Utilisé dans une faible proportion par les boues activées, l'évolution de cet élément comparée à la charge organique de l'effluent et exprimée par le rapport DCO/K ou COT/K peut rendre compte de la dégradation des matières organiques.

Le dosage de cet élément est susceptible de mettre en évidence des rejets diffus d'eaux résiduaires viti-vinicoles sur un ouvrage d'épuration urbain.

La forte teneur en sulfates dans la vinasse, due au traitement de stabilisation au persulfate d'ammonium n'a aucune incidence sur la qualité de l'effluent secondaire.

Conclusion

Les possibilités de rejets de vinasses sur une station urbaine ont pu être précisées grâce à une étude détaillée de l'oxygénation. Elle a souligné la nécessité de vérifier ce paramètre souvent sous-estimé dans les dimensionnements de tels ouvrages (C.T.G.R.E.F., 1974). L'hétérogénéité du flux polluant urbain détermine une mauvaise répartition de l'oxygène : limité le jour, abondant la nuit. Une programmation adéquate du fonctionnement du système d'aération permettrait de l'uniformiser et réduirait la consommation d'énergie.

L'évaluation de l'oxygène disponible pendant la période nocturne, seule susceptible d'accepter un apport polluant et des besoins en oxygène a permis de moduler le rejet de vinasse et d'harmoniser les charges appliquées.

L'expérimentation conduite pendant 36 jours consécutifs a clairement montré la dégradation poussée des matières organiques de la vinasse. Aucun effet néfaste n'a été constaté tant sur le fonctionnement que sur l'efficacité du traitement; l'effluent moyen étant conforme aux normes de rejet.

Cette modulation conduit à un accroissement de près de 25 p. 100 de la capacité

habituellement traitée sans recourir à un quelconque équipement supplémentaire. L'intérêt économique que présente ce type de traitement se double d'un intérêt technologique par la simplicité de l'opération.

Certes, la disproportion entre la capacité de la station et le potentiel de pollution d'une distillerie est un facteur limitant à la généralisation de ce mode de traitement. Le prétraitement des effluents de la distillerie devra être alors envisagé. Pour les industries agro-alimentaires au pouvoir polluant plus faible : caves de vinification, conserveries..., une modulation de leurs rejets devrait être compatible avec les potentialités de la station urbaine dans un plus grand nombre de cas.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciements

Cette étude a été financée en partie dans le cadre d'un contrat avec le Ministère de la Qualité de la Vie, Direction de la Prévention des Pollutions et Nuisances, Service de l'Environnement Industriel.

Les données concernant le volume d'eaux domestiques et les charges reçus par la station nous ont été aimablement communiquées par M. l'Ingénieur en Chef du Génie Rural des Eaux et des Forêts, Directeur Départemental de l'Agriculture de l'Aude.

Summary

Influence of discharging distillery waste water into an urban sewage treatment plant

The joint treatment of domestic sewage and wine distillery waste water has been studied on an urban plant working at full capacity. The oxygenation study has shown a nightly period able to recieve an organic load. The discharge modulation has been established on the quantity of available oxygen and oxygen needs.

An additional organic load of about 25 p. 100 of the usual capacity, discharged during the night, has modified neither the treatment efficiency nor the secondary effluent quality. The observed removal efficiency of distillery waste water was about 85 p. 100.

Références bibliographiques

BORIES A., 1976. Le carbone organique total. Méthodes modernes de mesure et intérêt de la détermination dans les eaux résiduaires. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 273-283.

BORIES A., 1978. Caractérisation de la charge organique des eaux résiduaires de distilleries vinicoles par le carbone organique total. *Tribune du CEBEDEAU*, **411**, 75-81.

BOUTIN P., VACHON A., BECHAC J.-P., LOPEZ B., 1975. Mesure de la capacité d'oxygénation dans les stations de traitement à boues activées en mélange intégral. *Techn. Sci. Municip. Eau.*, **11**, 493-501.

BROUZES, 1973. Précis d'épuration biologique par boues activées. *Technique et documentation.* Paris.

C.T.G.R.E.F., 1974. Note sur les performances des dispositifs d'oxygénation. *Division Qualité des Eaux, Pêche et Pisciculture*, Paris.

DEFOUG H., 1973. Déversement des eaux usées industrielles dans les réseaux publics d'assainissement : conditions techniques et financières. *Tribune du CEBEDEAU*, 357-358, 318-325.

ECKENFELDER W. W., 1966. *Industrial water pollution control*, 275 p., Mac GRAW-HILL, New-York.

FORD D. L., 1968. Application of the carbon analyser for industrial waste water evaluation. *23rd Industrial Waste Conf. Purdue University.*

LOISELEUR J., 1963. *Techniques de laboratoire.* Masson et Cie éd., **1** (2), 1273-1276.

MAUGENET J., RAYNAL J., BORIES A., 1977. Étude des odeurs issues des eaux résiduaires de distilleries : origine, caractéristiques et moyens de lutte. *C. R. fin de contrat Ministère de la Qualité de la Vie.*

MORFAUX J.-N., SARRIS J., CATROUX G., 1972. Relation entre la D.C.O. et le carbone organique des eaux résiduaires. Intérêt d'une méthode automatique de détermination simultanée de ces paramètres. *Industr. aliment. agric.*, **18**, 129-137.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1970. L'épuration des eaux résiduaires des distilleries vinicoles. *Tribune du CEBEDEAU*, **24**, 76-86.

PIPES W. O., 1967. Bulking of activated sludge. *Adv. appl. Microbiol.*, **9**, 185-234.

RAMBAUD A., BONTOUX J., 1974. Les effluents de l'industrie vinicole. 1re partie : Étude de la charge polluante des effluents d'une distillerie de marcs. *La Technique de l'Eau*, **326**, 31-36.

REBOUL B., 1976. Influence des rejets d'industries agro-alimentaires (distillerie vinicole et conserverie de fruits et légumes) sur le fonctionnement d'une station d'épuration d'eaux usées urbaines. *Thèse Docteur en Pharmacie*, Université de Montpellier, I, 311 p.

RIDEAU J.-P., MORFAUX J.-N., 1975. Les accidents de décantation dus au bulking des boues activées dans le traitement biologique des effluents d'industries agricoles et alimentaires. *La Technique de l'Eau*, **1** (339), 19-25; **2** (340), 17-27.

RODIER J., 1975. L'analyse de l'eau. **1**, 176-177. Dunod, Paris.

STUKENBERG J. R., WAHBEH V. N., Mc KINNEY R. E., 1977. Experiences in evaluating and specifying aeration equipment. *J. Water. Pollut. Control. Feder.*, **49**, 66-82.

TAKAHASHI Y., MOORE R. T., JOYCE R. J., 1972. Direct determination of organic carbon in water by reductive pyrolysis. *Amer. Labo.*, **4**, 31-38.

WUHRMANN K., 1964. Microbial aspects of water pollution control. *Adv. appl. Microbiol.*, **6**, 119-151.

ZUMBRUNN J.-P., 1973. Épuration par les produits peroxydés des eaux résiduaires polluées par les cyanures, sulfures, phénols aldéhydes et dérivés. *Tribune du CEBEDEAU*, 357-358; 332-341.

Ann. Technol. agric., 1977, **27**, (3), 695-713.

Effets de différents paramètres sur la destruction des pigments caroténoïdes de la farine de blé tendre au cours du pétrissage

J. NICOLAS

avec la collaboration technique de M. SOUKSAVANH O.

Laboratoire de Technologie alimentaire, I.N.R.A., C.E.R.D.I.A., 91305 Massy (France)

Résumé

Divers paramètres qui influencent la destruction des pigments caroténoïdes au cours du pétrissage de farines de blé tendre ont été étudiés. Plus la durée et la vitesse de pétrissage ainsi que l'hydratation sont élevées, plus la quantité de pigments détruits est importante. Cette destruction est attribuée essentiellement à la lipoxygénase présente dans la farine de blé qui, en agissant sur les acides gras polyinsaturés provoque la décoloration de la pâte par suite d'une oxydation couplée des pigments. Lorsque l'on accroît dans des proportions équivalentes l'activité lipoxygénasique de la farine par addition, soit de farine de fève, soit d'enzyme purifiée de fève ou de soja on observe une augmentation de la vitesse de destruction des pigments. L'acide ascorbique, l'eau oxygénée et le BHT, inhibiteurs du système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés diminuent la proportion de caroténoïdes oxydés pendant le pétrissage. La lipoxygénase ne semble pas être inhibée par l'eau oxygénée éventuellement formée lors de l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique; en effet, l'addition de catalase dans un milieu modèle ou de peroxydase du raifort à la pâte n'affecte pas le pouvoir inhibiteur de cet acide. Un pouvoir protecteur du chlorure de sodium vis-à-vis de l'oxydation a été observé et discuté. En dehors de la lipoxygénase, nous avons montré que la peroxydase du raifort peut également accélérer la destruction des caroténoïdes, probablement par un processus d'oxydation couplée avec celle des acides gras insaturés.

MOTS CLÉS : *Blé — Farine — Caroténoïdes — Destruction — Pétrissage.*

Introduction

La couleur joue un rôle important dans la qualité des farines et des semoules de blé. Les facteurs responsables de cette couleur sont essentiellement les pigments caroténoïdes contenus dans les produits de mouture (FARRE-ROVIRA et COSTES,

1974). D'après ces auteurs, la farine de blé tendre contient environ 3 ppm de caroténoïdes dont le principal constituant est la lutéine; comparativement la semoule de blé dur en contient deux fois plus. Les flavones, quoique en quantité sensiblement équivalente à celle des caroténoïdes dans le grain entier, se trouvent surtout localisées dans l'embryon et les enveloppes (CHEN et GEDDES, 1945) et par conséquent, affectent peu la couleur des farines.

Dans le cas du blé tendre, la blancheur des farines est considérée souvent comme un critère de qualité, puisqu'actuellement on procède dans de nombreux pays à la destruction des pigments après mouture en vue d'obtenir un pain ayant une mie blanche. Cependant, en France, il s'est produit un retournement de tendance du consommateur; en effet, la blancheur de la mie autrefois associé à une amélioration de la qualité est aujourd'hui souvent accompagnée d'une altération du goût (GUINET, 1974). Ces phénomènes sont dus à l'association de deux facteurs intervenant lors de la fabrication du pain français : l'utilisation du pétrissage intensifié et l'addition de farine de fève (DRAPRON *et al.*, 1974; ÉTIENNE et DUBOIS, 1974). La décoloration de la pâte, observée au cours du pétrissage, est accompagnée d'une modification du comportement rhéologique des pâtes conduisant à des pains plus développés.

Dans le cas du blé dur, la couleur jaune ambré des semoules, principalement due aux pigments caroténoïdes, est un facteur positif de la qualité des pâtes alimentaires (IRVINE, 1971; LAIGNELET *et al.*, 1972).

Depuis de nombreuses années, la destruction des pigments au cours de la panification et plus particulièrement pendant le pétrissage a été attribuée à l'action de la lipoxygénase (EC. 1.13.11.12) (MILLER et KUMMEROW, 1948; IRVINE et WINKLER, 1950; HAWTHORN et TODD, 1955; TSEN et HLYNKA, 1962; C.N.E.R.N.A., 1962). Par ailleurs, MATSUO *et al.* (1970) ont observé que le système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés était le principal responsable de l'oxydation des pigments au cours de la fabrication des pâtes alimentaires. L'enzyme fixe l'oxygène de l'air et oxyde les acides gras polyinsaturés dont le plus important quantitativement est l'acide linoléique. Les pigments caroténoïdes, liposolubles, sont détruits par un processus d'oxydation couplée.

La peroxydase, la catalase et d'une manière générale les composés hématiniques sont également capables de provoquer l'oxydation des pigments au cours du pétrissage, mais dans une proportion beaucoup moindre (HAWTHORN et TODD, 1955). En dehors des travaux de KIES *et al.* (1969) faisant état de l'existence possible d'une carotène oxydase spécifique, celle-ci n'a jamais été mise en évidence depuis et les auteurs s'accordent à dire que la destruction des pigments caroténoïdes s'effectue uniquement par oxydation couplée : ce phénomène a été mis à profit pour mettre au point le premier dosage d'activité lipoxygénasique (SUMNER et SUMNER, 1940).

Un certain nombre d'adjuvants sont susceptibles d'influencer la destruction des caroténoïdes au cours de la panification. C'est ainsi que la farine de fève, riche en lipoxygénase, utilisée en panification française favorise l'oxydation de ces pigments (DRAPRON *et al.*, 1971). Par ailleurs, afin d'obtenir un pain à la mie plus blanche, le technicien boulanger n'ajoute le chlorure de sodium qu'en fin de pétrissage (BERGER et GRANDVOINNET, 1977). Parallèlement, en pastification, l'addition d'acide ascorbique provoque une diminution de la perte en pigments caroténoïdes (MILATOVIC, 1967; WALSH *et al.*, 1970).

Les travaux rapportés ici ont pour but d'étudier la cinétique de destruction des caroténoïdes au cours du pétrissage. En premier lieu, nous examinerons l'influence de paramètres physicochimiques tels que la durée et la vitesse de pétris-

sage ainsi que l'hydratation de la pâte. En second lieu, nous étudierons les effets de plusieurs additifs. Pour préciser l'importance de la lipoxygénase, nous avons ajouté à la pâte, de la farine de fève, de l'acide ascorbique, des préparations purifiées de lipoxygénase de fève et de soja, de l'eau oxygénée et un antioxygène phénolique le 2,6-di-tert-butyl-*p*-crésol (Butyl-Hydroxy-Toluène ou BHT). Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de l'addition d'une peroxydase commerciale ainsi que du chlorure de sodium. Cette étude a porté sur deux farines commerciales de blé, l'une de l'année 1974 et l'autre de 1976 possédant des caractéristiques rhéologiques différentes.

Matériel et méthodes

Farines utilisées

Les principales caractéristiques analytiques des farines sont rapportées dans le tableau I.

TABLEAU I

Principales caractéristiques analytiques des farines de blé utilisées

	Farine A (1974)	Farine B (1976)
Humidité	15 p. 100	15,4 p. 100
Protéines/matière sèche (N × 5,7)	11,1 p. 100	12,2 p. 100
Cendres/matière sèche	0,52 p. 100	0,50 p. 100
Pigments caroténoïdes extraits de 10 g de farine (D.O. à 446 nm)	0,41	0,45
Caractéristiques alvéographiques		
P	41	68
G	27,6	23,3
W	148	215
P/L	0,26	0,62
Activités enzymatiques		
Activité lipoxygénasique (ULPX/g) (à pH 7)	1,4	1,2
Activité peroxydasique (D.O. 465 nm/mn.g)	85	75

La farine de fève d'origine industrielle présente une activité lipoxygénasique de 180 ULPX/g.

Conditions de pétrissage et additifs

L'essai témoin est conduit de la manière suivante :

300 g de farine sont pétris pendant 12 min. avec 150 ml d'eau (hydratation de la pâte 43 p. 100) dans le pétrin d'un farinographe Brabender thermostaté à 30 °C, la vitesse de rotation du moteur d'entraînement étant fixée à 56 tours par min. Des prises aliquotes de 20 g de pâte sont effectuées toutes les deux minutes.

Dans d'autres essais, nous avons fait varier la quantité d'eau ajoutée de 120 à 190 ml (hydratation de la pâte de 39 p. 100 à 48 p. 100) et la vitesse de rotation de 20 à 100 t/min.

Les différents additifs utilisés, leurs doses, leurs modes d'addition et leurs origines sont indiqués dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Modes d'addition, doses et origines des différents additifs étudiés

Additifs	Doses pour 300 g de farine de blé	Mode d'addition	Origine
NaCl	3,75 g (1,25 p. 100)	en solution aqueuse	Chimiquement pur
Farine de fève	3 g (1 p. 100)	dans la farine de blé	Industrielle
2,6-di-*t*-butyl-*p*-crésol (BHT)	5,5 mg (18 ppm)	0,1 ml de solution alcoolique (0,25 M) ajoutée à la farine avant l'eau	Chimiquement pur
H_2O_2	0,25 ml à 30 p. 100	en solution aqueuse	Chimiquement pure
Lipoxygénase purifiée de fève	1 000 ULPX (à pH 7)	en solution aqueuse	Purifiée selon BEAUX *et al.* (1973)
Lipoxygénase purifiée de soja	600 ULPX (à pH 9)	en solution aqueuse	SIGMA Type 1
Peroxydase de raifort	50 mg à 75 Unités/mg	en solution aqueuse	SIGMA Type 1
Acide ascorbique	de 4,5 à 45 mg (15 à 150 ppm)	en solution aqueuse	Chimiquement pur

Mesures d'activités enzymatiques

L'extrait enzymatique de farine de blé est préparé de la manière suivante :

10 g de farine de blé sont mis en suspension pendant 30 min. dans 25 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5. Après 20 min. de centrifugation à 27 000 g, le surnageant constitue l'extrait enzymatique.

Lipoxygénase

Le dosage est effectué par la mesure polarographique de la consommation d'oxygène en utilisant l'acide linoléique comme substrat, suivant les conditions décrites par NICOLAS et DRAPRON (1977*a*). Pour l'étude de l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique en milieu modèle, celui-ci est ajouté à diverses concentrations à la solution de substrat en présence de lipoxygénase purifiée à partir de la fève (BEAUX *et al.*, 1973). Pour vérifier la présence éventuelle d'eau oxygénée, nous avons utilisé une préparation commerciale de catalase de foie de bœuf (origine NBC). L'unité lipoxygénasique (ULPX) est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque la consommation d'une micromole d'oxygène par minute dans les conditions du dosage.

Peroxydase

Le dosage est effectué par la mesure spectrophotométrique de l'augmentation de l'absorption à 465 nm à partir d'un mélange réactionnel contenant du gaïacol (4 mM), de l'eau oxygénée (4 mM), du chlorure de calcium (1 mM) et 3 µl d'extrait enzymatique pour un volume final de 3 ml dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 5 suivant les conditions décrites par JEANJEAN *et al.* (1975). L'unité peroxydasique est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque l'augmentation d'une unité de densité optique à 465 nm par minute dans les conditions du dosage.

Dosages des pigments caroténoïdes

Les caroténoïdes étant partiellement associés aux lipides liés, l'extraction des constituants lipidiques totaux est effectuée par la technique décrite par TSEN *et al.* (1962).

20 g de pâte sont dispersés à l'aide d'un mixeur dans un mélange de méthanol (50 ml), de chloroforme (25 ml) et d'eau (20 ml); la quantité d'eau à ajouter est calculée en tenant compte de l'eau déjà présente dans la pâte. Après 2 min d'agitation, 25 ml de chloroforme sont ajoutés et la dispersion est poursuivie durant 30 s. Après addition de 25 ml d'eau, l'homogénéisation finale est effectuée pendant 30 s. Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 15 min. la température étant maintenue à 4 °C. La phase chloroformique contenant les pigments caroténoïdes est séparée de la phase méthanol-eau par décantation. Le chloroforme est éliminé par évaporation sous vide. Le résidu est redissous quantitativement dans 10 ml de cyclohexane et le spectre d'absorption de l'extrait lipidique est enregistré entre 350 et 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Techtron 635 M équipé d'une table traçante. La proportion de pigments détruits à un temps *t* du pétrissage de la pâte est exprimé comme le rapport :

$$\frac{D.O._t = 0 - D.O._t}{D.O._t = O}$$

où $D.O._{t=0}$ représente la densité optique à 446 nm des pigments extraits de la farine et $D.O._t$, la densité optique à 446 nm des pigments extraits de la pâte pétrie pendant le temps *t*. Les valeurs de densités optiques sont éventuellement corrigées de la turbidité.

Résultats et discussion

Influence de la durée du pétrissage

Sur la figure 1, on observe une augmentation de la destruction des pigments lorsque la durée du pétrissage augmente. Pendant la phase initiale, la vitesse de destruction est constante, puis elle diminue après 50 p. 100 de destruction, ce phénomène ayant lieu plus rapidement avec la farine B qu'avec la farine A.

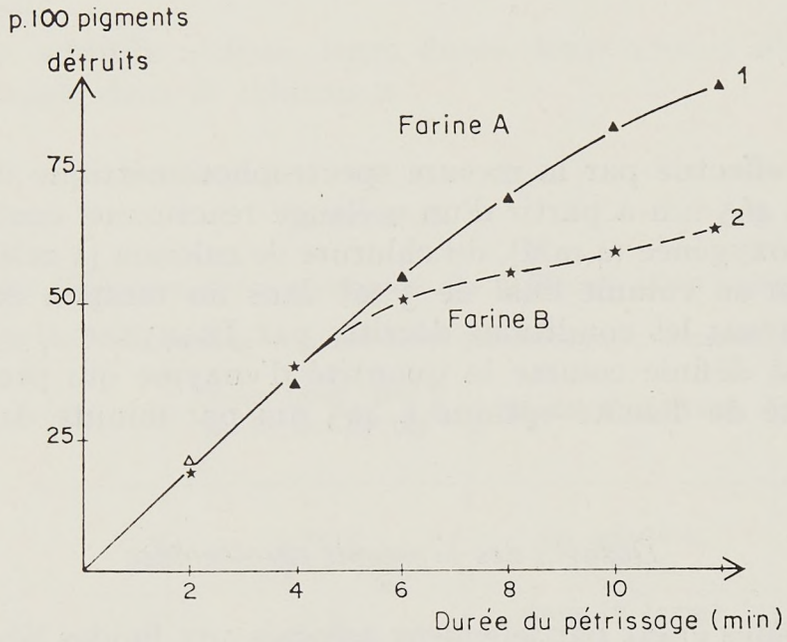


FIG. 1. — *Influence de la durée du pétrissage sur la destruction des pigments caroténoïdes*

(1) Farine A (2) Farine B
Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

Lors d'une étude sur la destruction des pigments au cours du pétrissage des semoules de blé dur, IRVINE et WINKLER (1950) ont observé une cinétique de destruction comportant trois phases : une phase initiale très rapide pendant la première minute, une deuxième phase plus lente jusqu'à 6 min. de pétrissage et au-delà, la vitesse de destruction diminue encore. Avec la farine de blé tendre, après 6 min. de pétrissage nous observons également une diminution de la vitesse sans toutefois constater de phase initiale très rapide; cette différence pourrait s'expliquer soit par un comportement différent des blés tendres qui, d'une manière générale, possèdent moins de pigments caroténoïdes et plus de lipoxygénase, soit par le traitement différent effectué sur les pâtes après pétrissage en vue de l'extraction des pigments, en effet, IRVINE et WINKLER ont extrait les pigments par du butanol saturé d'eau à partir de disques de pâte séchés puis broyés, la valeur initiale de la teneur en pigments étant déterminée directement sur la semoule. Lorsque la durée du pétrissage excède 6 min. (fig. 1), la quantité de pigments détruits augmente plus lentement pour la farine B que pour la farine A. Ce phénomène pourrait être dû à une inactivation plus rapide de la lipoxygénase dans la farine B. Toutefois, les activités initiales des deux farines sont très proches, et voisines des

valeurs moyennes trouvées par COLAS et CHARGELEGUE (1974) pour différentes variétés de blé français de la récolte 1967. On peut faire également l'hypothèse que la farine B contient une quantité moindre d'acides gras polyinsaturés libres directement oxydables par la lipoxygénase. Cependant, lorsqu'on ajoute de la lipoxygénase en excès sous forme de farine de fève, la destruction est quasi totale après 10 min. de pétrissage (fig. 5*b*). Il semble donc que la lipoxygénase de la fève contrairement à celle du blé soit capable d'agir non seulement sur les acides gras polyinsaturés libres, mais également sur ceux engagés dans les glycérides, comme cela a été montré pour celle du soja (GUSS *et al.*, 1968; MANN et MORRISSON, 1975).

Influence de la vitesse de pétrissage

L'effet de l'intensité du pétrissage sur la destruction des pigments a déjà été signalé par HAWTHORN et TODD (1955), puis DRAPRON *et al.* (1971) qui avaient indiqué que l'utilisation du pétrissage intensifié provoquait une décoloration de la pâte beaucoup plus importante que le pétrissage lent. Nous avons précisé

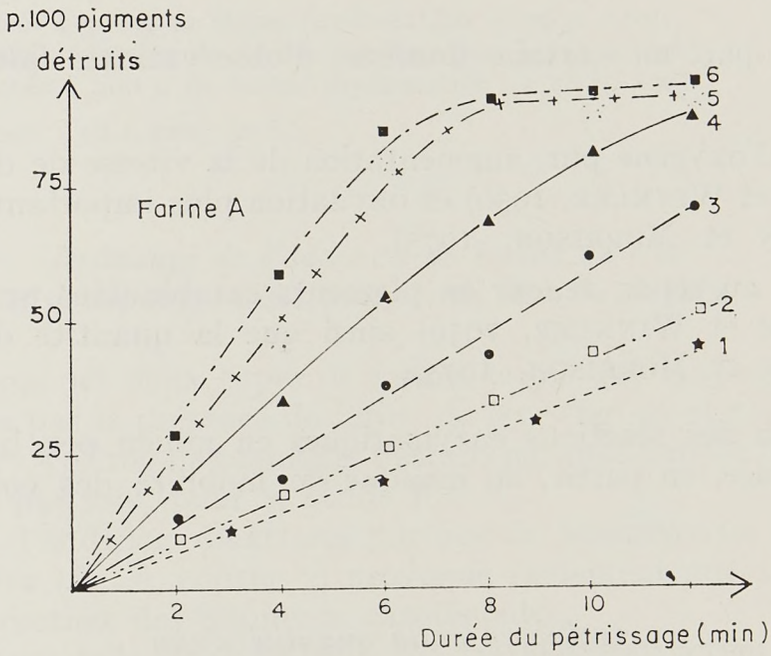


FIG. 2. — *Influence de la vitesse de pétrissage sur la destruction des pigments caroténoïdes à 30 °C (Farine A), hydratation 43 p. 100*

(1) 20 t/min (2) 32 t/min
(3) 40 t/min (4) 56 t/min
(5) 80 t/min (6) 100 t/min

cet effet en étudiant les quantités de pigments détruits en fonction du temps à différentes vitesses de pétrissage (fig. 2). Sur la figure 3, tirée de la figure précédente, on a la vitesse de destruction des pigments en fonction de la vitesse de pétrissage. On observe jusqu'à 80 t/min, une relation linéaire entre ces deux grandeurs. L'existence d'une proportionnalité entre les vitesses de destruction des pigments et les vitesses de pétrissage, au moins jusqu'à 80 t/min. dans le pétrin du farinographe, semble indiquer la présence de deux facteurs limitants : l'apport d'oxygène et le renouvellement des contacts enzyme-substrat. Ces hypothèses

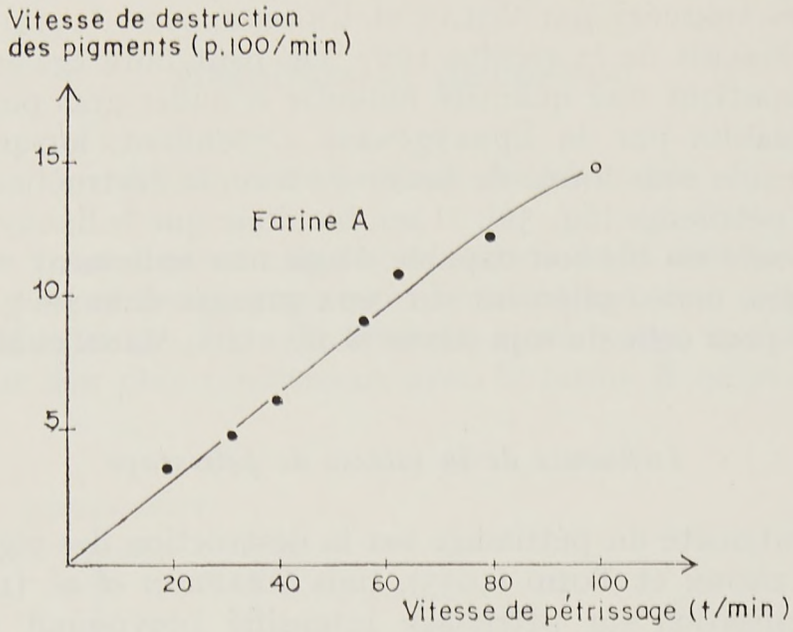


FIG. 3. — *Influence de la vitesse de pétrissage sur la vitesse de destruction des pigments caroténoïdes*

sont confirmées par un certain nombre d'observations faites par d'autres chercheurs :

— En présence d'oxygène pur, augmentation de la vitesse de décoloration de la pâte (IRVINE et WINKLER, 1950) et oxydation plus importante de l'acide linoléique (MANN et MORRISON, 1975).

— Dans la pâte au repos, teneur en pigments caroténoïdes pratiquement constante (IRVINE et WINKLER, 1950) ainsi que la quantité d'acide linoléique oxydé (MANN et MORRISON, 1975).

La limitation des réactions enzymatiques en milieu peu hydraté solide est également attribuée, en partie, au manque de mobilité des constituants (DRAPRON, 1972).

Influence de la quantité d'eau

On constate sur la figure 4, que dans la phase initiale de pétrissage, la vitesse de décoloration augmente très légèrement quand la quantité d'eau ajoutée augmente, alors qu'après 8 min. de pétrissage à 56 t/min. la différence n'est plus perceptible.

Un effet similaire est observé par IRVINE et WINKLER (1950) avec de la semoule de blé dur lorsque l'hydratation passe de 27 à 35 p. 100, cependant lorsque celle-ci dépasse 33 p. 100 la vitesse de décoloration n'augmente plus.

Nous pouvons supposer que cette décoloration plus rapide est liée à la quantité d'oxygène dissous dans la phase aqueuse et directement utilisable par la lipoxygénase. Lorsque nous avons utilisé de l'eau exempte d'oxygène, nous avons observé une vitesse initiale plus faible, mais très rapidement après 4 min. de pétrissage, cette vitesse rejoint celle observée avec de l'eau contenant de l'oxygène dissous. Par ailleurs, au fur et à mesure que l'hydratation croît, la mobilité augmente et les contacts enzyme-substrat en sont d'autant facilités.

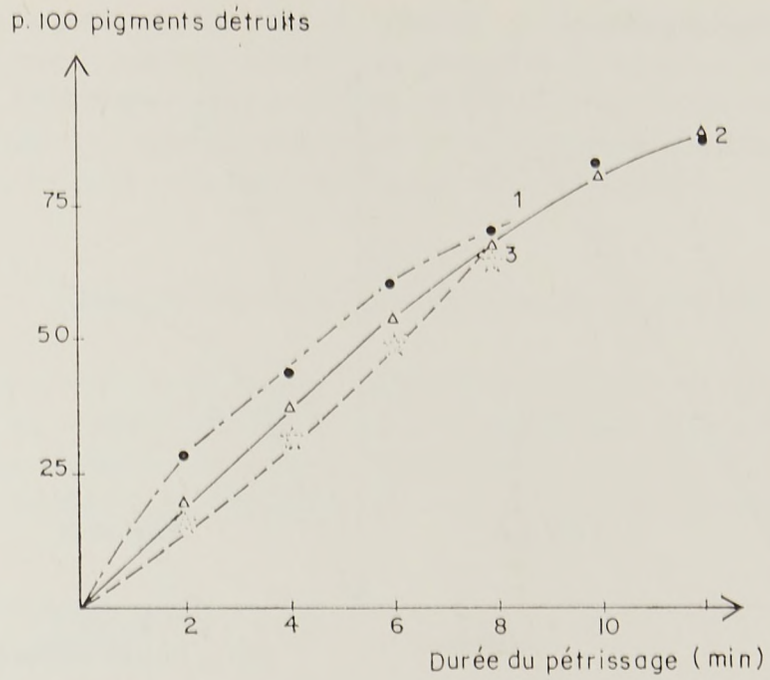


FIG. 4. — *Influence de la quantité d'eau ajoutée sur la destruction des pigments caroténoïdes (Farine A).*

(1) 120 ml d'eau ajoutés à 300 g de farine (hydratation = 39 p. 100).
(2) 150 ml d'eau ajoutés à 300 g de farine (hydratation = 43 p. 100).
(3) 190 ml d'eau ajoutés à 300 g de farine (hydratation = 48 p. 100).
Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C.

Influence de l'addition de farine de fève et de lipoxygénases purifiés de fève ou de soja

On observe pour les deux types de farine de blé que la destruction des pigments est accélérée par la présence de farine de fève (fig. 5*a* et 5*b*). La vitesse initiale passe de 9 à 17,5 p. 100 de pigments détruits par min. dans le cas de la farine A et 9,5 à 19 p. 100 par min. pour la farine B.

D'autre part, l'addition d'extraits purifiés de lipoxygénase de soja (fig. 6, courbe 2) et de fève (fig. 6, courbe 3) provoque également une augmentation de la vitesse de destruction des pigments caroténoïdes.

L'effet activateur de la farine de fève vis-à-vis de la destruction des caroténoïdes déjà signalé par DRAPRON *et al.* (1971) et ÉTIENNE et DUBOIS (1974) a été attribué à la lipoxygénase qu'elle contient. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse puisque la vitesse de destruction est pratiquement deux fois plus grande lorsqu'on ajoute 1 p. 100 de farine de fève, ce qui revient à doubler l'activité enzymatique. Nous avons observé le même effet sur la vitesse d'oxydation des pigments lorsque le pétrissage est conduit à 32 t/min., c'est-à-dire à peu près deux fois moins vite. Toutefois, l'addition de lipoxygénase de soja purifiée à une dose telle que l'on double l'activité ne provoque pas une augmentation proportionnelle de la vitesse de destruction (fig. 6, courbe 2). Dans ce cas, il faut noter que l'optimum d'activité de cette préparation purifiée se situe à pH 9, alors que les lipoxygénases du blé et de la fève ont un pH optimum voisin de 6,5 et 6,8 (IRVINE et ANDERSON, 1953; NICOLAS et DRAPRON, 1977*a*). Étant donné que le pH de la pâte est voisin de 5,5, la préparation de lipoxygénase de soja n'agit pas à son optimum. En ce qui concerne la lipoxygénase de la fève, la quantité d'extrait purifié rajoutée correspond à un triplement de l'activité sans pour autant que la vitesse de destruc-

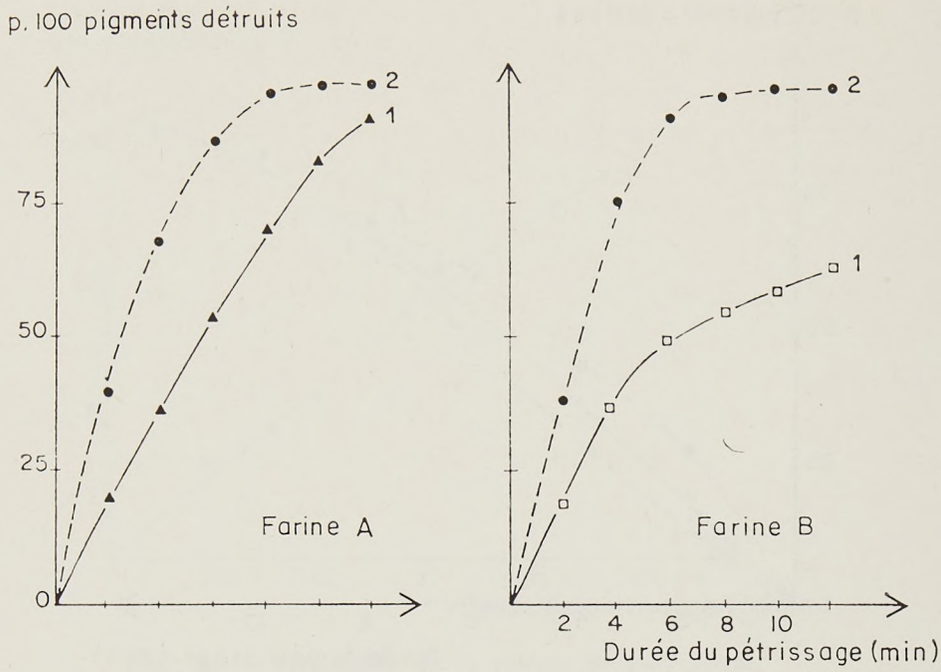


FIG. 5. — *Influence de la farine de fève sur la destruction des pigments caroténoïdes.*

Fig. 5*a* : (1) courbe témoin (farine A).
(2) témoin + 1 p. 100 de farine de fève.

Fig. 5*b* : (1) courbe témoin (farine B).
(2) témoin + 1 p. 100 de farine de fève.

Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100

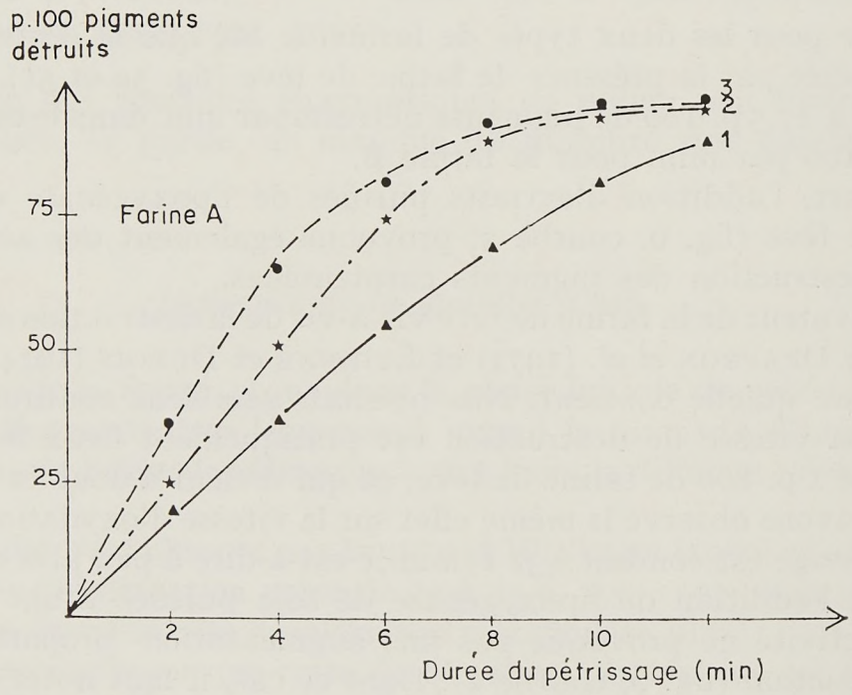


FIG. 6. — *Influence de la présence de fractions purifiées de lipoxygénase de soja et de fève sur la destruction des pigments caroténoïdes (Farine A)*

(1) Courbe témoin.
(2) Témoin + 600 ULPX de lipoxygénase de soja (SIGMA).
(3) Témoin + 1 000 ULPX de lipoxygénase de fève.

Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

tion des pigments soit triplée (fig. 6, courbe 3). Il est probable dans ce dernier cas que les facteurs limitants soient : la quantité d'oxygène incorporée à la pâte ou la quantité d'acides gras polyinsaturés ou le renouvellement des contacts enzymes substrat ou plutôt une combinaison des trois. Expérimentalement, il n'est guère possible de faire la part revenant à chacun de ces facteurs.

Influence de l'addition de chlorure de sodium

On constate sur la figure 7 que l'addition de chlorure de sodium provoque une diminution de la vitesse d'oxydation des pigments caroténoïdes. Ce résultat confirme les observations empiriques faites par les techniciens boulangers quant à l'influence du moment de l'addition du sel au cours du pétrissage, sur la couleur

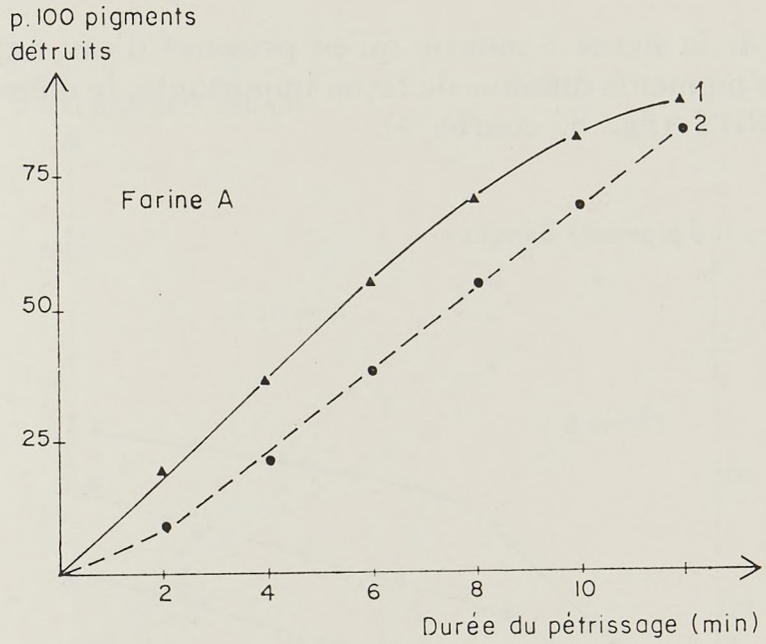


FIG. 7. — *Influence du chlorure de sodium sur la destruction des pigments caroténoïdes (Farine A).*

(1) Courbe témoin.
(2) Témoin + 1,25 p. 100 de NaCl.
Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

de la mie (BERGER et GRANDVOINNET, 1977). En outre, lorsqu'on examine les résultats de MANN et MORRISON (1975), on constate que le chlorure de sodium entraîne une légère diminution de la quantité d'acide linoléique oxydé au cours du pétrissage. Ces auteurs indiquent que la présence de chlorure de sodium favorise la formation d'hydroxyépoxyoctadécènoïque plutôt que du trihydroxyoctadécènoïque, composés résultant de la transformation enzymatique des hydroperoxydes formés par la lipoxygénase (GRAVELAND, 1970*a* et *b*). Quoiqu'il en soit, nous avons constaté qu'en milieu modèle, ce sel n'a aucun effet inhibiteur sur l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase (NICOLAS, 1977).

MECHAM et WEINSTEIN (1952) ont signalé d'autre part, que l'addition de NaCl provoque une diminution de la proportion des lipides liés et POMERANZ *et al.* (1968) ont précisé que les lipides ainsi libérés avaient un caractère non polaire. Il est bien connu que la présence de sel provoque un raffermissement de la pâte, se

rapprochant en ce sens de l'action des oxydants chimiques. Selon DANIELS *et al.* (1970) et FRAZIER *et al.* (1973), l'action oxydante de la lipoxygénase contenue dans la farine de soja ajoutée à la pâte, se traduit par une libération de lipides au cours du pétrissage. Il en résulte que le chlorure de sodium a un effet comparable à celui des oxydants vis-à-vis des pâtes de farine de blé, à ceci près qu'il augmente également leur extensibilité mesurée à l'extensigraphe (BLOSKMA, 1971), alors que les oxydants chimiques ont un effet inverse. La libération des lipides non polaires provoquée par l'addition de chlorure de sodium pourrait expliquer son effet inhibiteur vis-à-vis de la destruction des pigments, puisqu'en dehors du substrat de la lipoxygénase il mettrait en présence dans le milieu, une quantité accrue d'acides gras autres que les polyinsaturés, inhibiteurs compétitifs de cette enzyme (HOLMAN, 1947).

Influence de l'addition d'eau oxygénée et de BHT

La courbe 3 de la figure 8 montre qu'en présence d'eau oxygénée, la vitesse de destruction des pigments diminue de façon importante, le même effet est observé en présence de BHT (fig. 8, courbe 2).

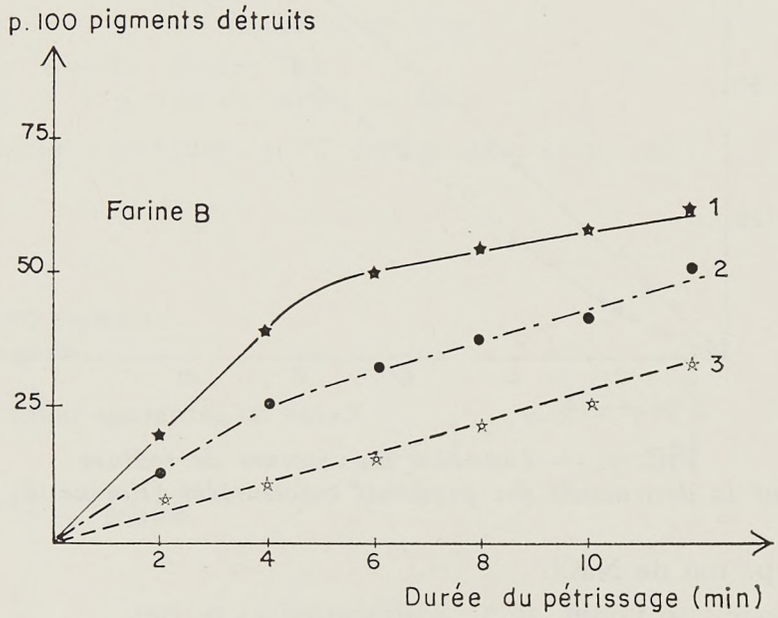


FIG. 8. — *Influence du BHT et de l'eau oxygénée sur la destruction des pigments caroténoïdes (Farine B).*

(1) Courbe témoin.
(2) Témoin + 5,5 mg (18 ppm) de BHT.
(3) Témoin + 0,25 ml d'eau oxygénée à 30 p. 100.

Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

L'eau oxygénée pourrait avoir deux actions antagonistes vis-à-vis de l'activité lipoxygénasique : une action activatrice et une action inhibitrice. En effet, la farine de blé contient des quantités non négligeables de catalase (IRVINE *et al.*, 1954) susceptibles de décomposer l'eau oxygénée en eau et oxygène, lequel pourrait être directement utilisé par le système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés. Par contre, l'eau oxygénée inhibe irréversiblement la lipoxygénase de soja (MITSUDA *et al.*, 1967; EGMOND *et al.*, 1975). Nous avons constaté le même effet inhibiteur vis-à-vis de la lipoxygénase de la fève (NICOLAS, 1977). Il semble donc que

cette action inhibitrice soit prépondérante pour expliquer la diminution de la vitesse de destruction des caroténoïdes.

L'effet protecteur du BHT vis-à-vis des pigments est à rapprocher de celui déjà observé avec le NDGA (*) (HAWTHORN et TODD, 1955; FRAZIER *et al.*, 1977). Ces deux antioxygènes sont des inhibiteurs puissants de la lipoxygénase (SIDDIQI et TAPPEL, 1967; NICOLAS et DRAPRON, 1977*b*). En fixant les radicaux libres formés au cours de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique, le BHT ralentit la destruction des pigments caroténoïdes par oxydation couplée.

Influence de l'addition d'acide ascorbique

Sur la figure 9*a* sont rapportées les courbes montrant les quantités de pigments détruits au cours du pétrissage en absence (courbe 1) et en présence d'acide ascorbique (courbes 2, 3 et 4).

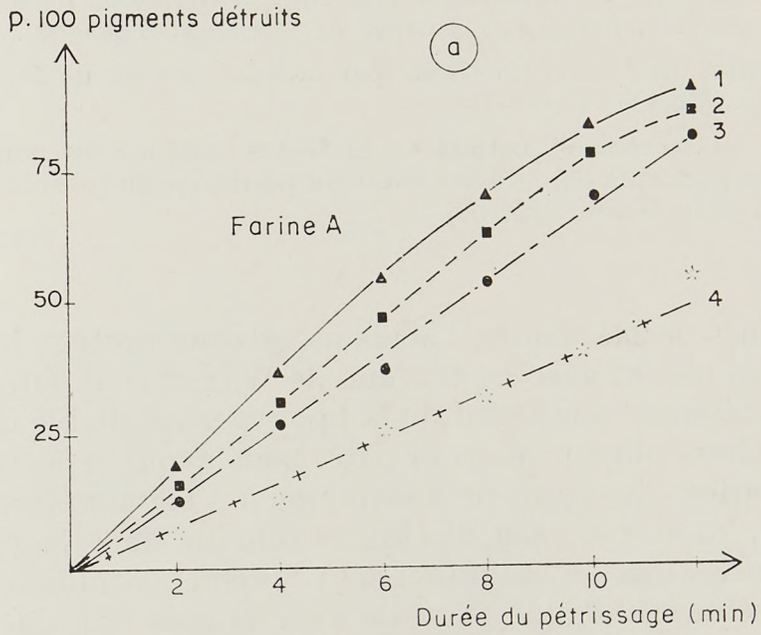


FIG. 9*a*. — *Influence de l'acide ascorbique sur la destruction des pigments caroténoïdes (Farine A).*

(1) Courbe témoin.
(2) Témoin + 4,5 mg (15 ppm) d'acide ascorbique.
(3) Témoin + 9 mg (30 ppm) d'acide ascorbique.
(4) Témoin + 45 mg (150 ppm) d'acide ascorbique.

Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

Lorsque l'on ajoute 15 ppm d'acide ascorbique, la vitesse n'est plus que de 89 p. 100 par rapport à celle mesurée avec la farine témoin; avec 30 et 150 ppm, les pourcentages correspondants sont de 72 et 46. La figure 9*b* représente l'inhibition de la lipoxygénase purifiée de la fève provoquée par l'acide ascorbique.

On constate que l'inhibition est peu sensible pour des concentrations inférieures à 10 μM. Entre 10 et 20 μM elle augmente rapidement; au-delà de ces concentrations le pourcentage d'inhibition varie plus lentement. Ainsi au cours du

(*) NDGA : acide nordihydroguaïarétique.

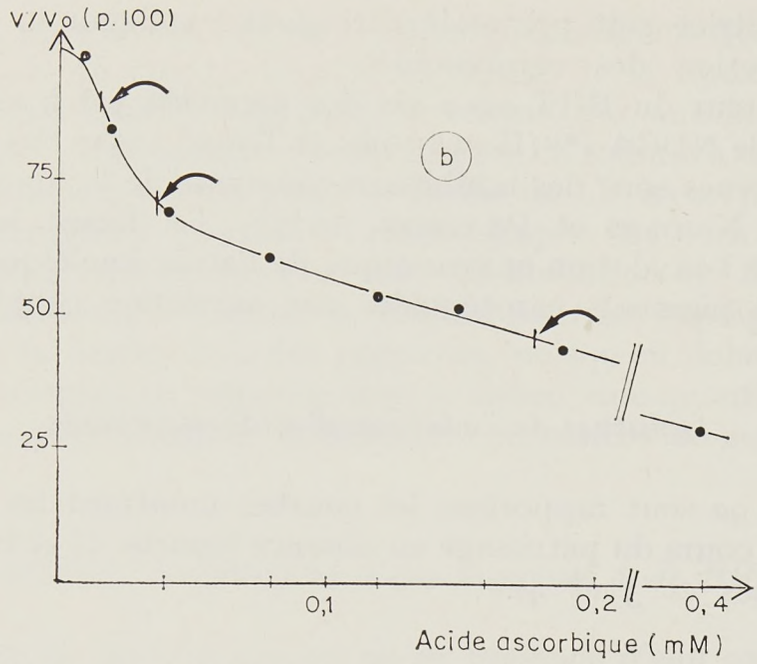


FIG. 9*b*. — *Influence de l'acide ascorbique sur l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase purifiée de fève (milieu modèle).*

V_0 = Vitesse d'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase de fève.
V = Id. en présence d'acide ascorbique.

Conditions de dosage : cf. matériel et méthodes. Les flèches indiquent les pourcentages de vitesse de destruction des pigments observés au cours du pétrissage en présence d'acide ascorbique par rapport à la pâte témoin (fig. 9*a*).

pétrissage des farines de blé tendre, l'acide ascorbique protège les pigments caroténoïdes. Ceci est en accord avec les travaux de WALSH *et al.* (1970) montrant que cet acide est un inhibiteur compétitif de la lipoxygénase de blé dur. Afin de comparer avec les résultats obtenus dans la pâte, nous avons reporté (flèches) sur la figure 9*b* les diminutions de vitesse de destruction des pigments (89, 72 et 46 p. 100) observées avec 15, 30 et 150 ppm d'acide ascorbique dans la pâte. On constate que les mêmes pourcentages d'inhibition sont obtenus en milieu modèle lorsque la concentration en acide ascorbique passe de 17 à 36 puis 174 µM. Par conséquent, les rapports des concentrations en acide ascorbique conduisant aux mêmes pourcentages d'inhibition dans la pâte et en milieu modèle sont constants.

GUILLEMET *et al.* (1945) ont émis l'hypothèse que l'effet améliorant de l'acide ascorbique sur les qualités plastiques des pâtes, pouvait être dû à la formation d'eau oxygénée lors de son oxydation en acide déhydroascorbique. Dans ces conditions l'eau oxygénée formée pourrait conduire à une inhibition de l'action de la lipoxygénase puisque celle-ci est un inhibiteur puissant de cette dernière (MITSUDA *et al.*, 1967; EGMOND *et al.*, 1975). Cependant, en milieu modèle cela ne semble pas être le cas puisque nous avons constaté que la présence de catalase dans le milieu réactionnel n'affecte en rien l'inhibition par l'acide ascorbique.

Influence de l'addition de peroxydase

On constate que l'addition de 50 mg de peroxydase de raifort purifiée, à 300 g de farine fait passer la vitesse initiale de destruction des pigments de 9 (témoin) à 13 p. 100 /min. (P) environ (fig. 10*a* et *b*, courbes 1 et 2). En présence de 150 ppm d'acide ascorbique le même phénomène se produit et la vitesse initiale passe de

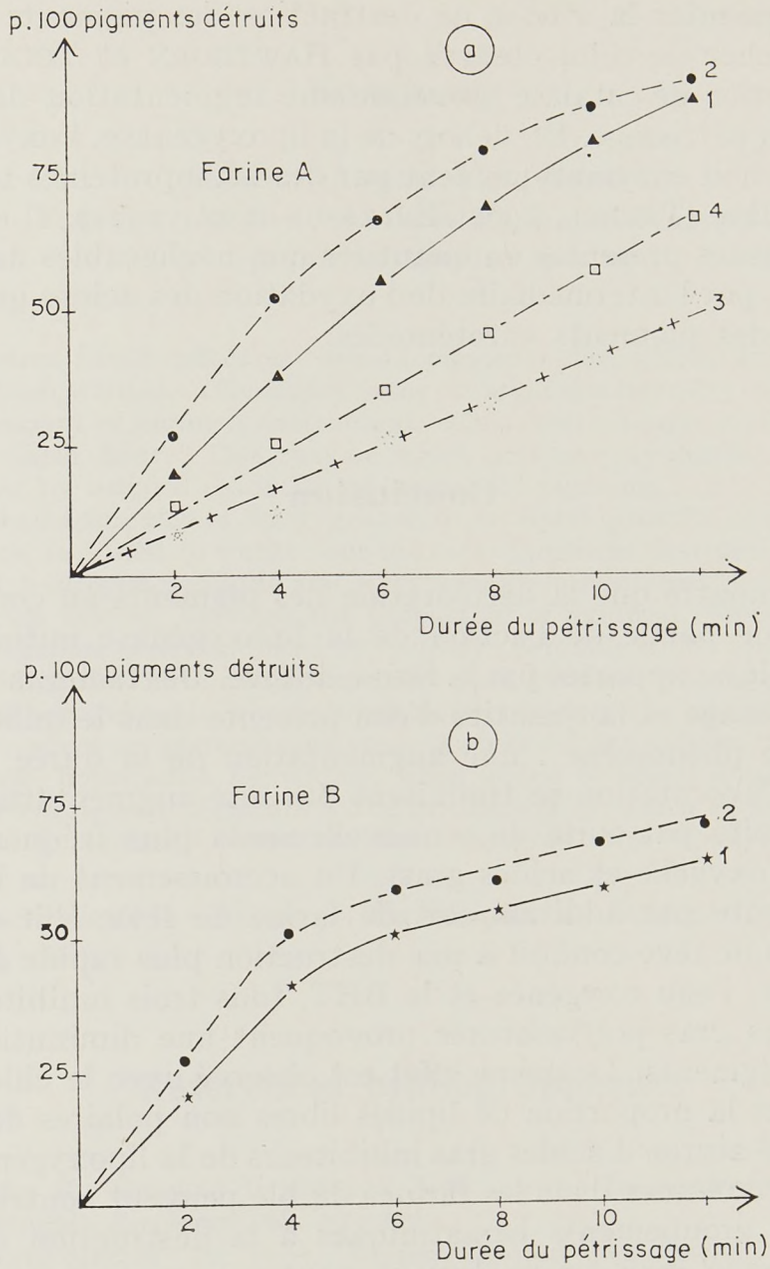


FIG. 10. — *Influence de la peroxydase purifiée de raifort sur la destruction des pigments caroténoïdes.*

Fig. 10*a* : (1) Courbe témoin (farine A).
(2) Témoin + 50 mg de peroxydase (SIGMA).
(3) Témoin + 45 mg d'acide ascorbique.
(4) Témoin + 45 mg d'acide ascorbique + 40 mg de peroxydase (SIGMA).

Fig. 10*b* : (1) Courbe témoin (farine B).
(2) Témoin + 50 mg de peroxydase (SIGMA).

Conditions de pétrissage : 56 t/min, 30 °C, hydratation 43 p. 100.

4,1 (A) à 6 p. 100/min (P + A) (fig. 10*a*, courbes 3 et 4). On peut encore observer que le rapport des vitesses de destruction des pigments $\frac{P + A}{A}$ est conservé lorsque l'acide ascorbique n'est pas ajouté à la pâte $\frac{P}{\text{témoin}}$. Il en résulte que dans les pâtes, la peroxydase ne semble pas affecter le pouvoir inhibiteur de l'acide ascorbique vis-à-vis du système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés.

Indépendamment de la présence d'acide ascorbique, la peroxydase de raifort

est capable d'augmenter la vitesse de destruction des pigments caroténoïdes. Ce fait est à rapprocher de celui observé par HAWTHORN et TODD (1955) qui ont montré que l'addition de catalase provoque une augmentation des pertes en pigments au cours du pétrissage. En dehors de la lipoxygénase, l'oxydation des acides gras est catalysée non enzymatiquement par des hémoprotéines telles que la peroxydase et la catalase (TAPPEL, 1962; ERIKSSON *et al.*, 1971). Il est vraisemblable que ces deux enzymes présentes en quantités non négligeables dans les farines de blé sont capables, par l'intermédiaire de l'oxydation des acides gras de contribuer à la destruction des pigments caroténoïdes.

Conclusion

Nous avons montré que la décoloration des pigments au cours du pétrissage provient en grande partie de l'action de la lipoxygénase initialement présente dans la farine de blé ou apportée par la farine de fève. Des facteurs tels que la durée, la vitesse du pétrissage et la quantité d'eau présente dans le milieu, interviennent sur l'évolution du phénomène : une augmentation de la durée, de la vitesse de pétrissage et de l'hydratation se traduisent par une augmentation de la quantité de pigments détruits par suite de renouvellements plus fréquents des contacts enzyme-substrat (oxygène et acides gras). Un accroissement de l'activité lipoxygénasique de la pâte par addition soit de farine de fève, soit de lipoxygénase purifiée de soja ou de fève conduit à une destruction plus rapide des caroténoïdes. L'acide ascorbique, l'eau oxygénée et le BHT, tous trois inhibiteurs du système lipoxygénase-acides gras polyinsaturés provoquent une diminution de la vitesse d'oxydation des pigments. Le même effet est observé avec le chlorure de sodium qui en augmentant la proportion de lipides libres non polaires dans la pâte libérerait une quantité accrue d'acides gras inhibiteurs de la lipoxygénase. La catalase et la peroxydase contenues dans les farines de blé peuvent contribuer par l'intermédiaire de leurs groupements hématiniques à la destruction des caroténoïdes pendant le pétrissage mais probablement pour une part moins importante.

D'un point de vue pratique, l'addition de sel et d'acide ascorbique ainsi que la présence éventuelle d'antioxygènes naturels (tels que les polyphénols) dans la farine de blé sont des facteurs capables de contrebalancer l'effet exagéré de l'action de la lipoxygénase de la fève en pétrissage intensifié en ce qui concerne la décoloration des pâtes et en définitive de la mie de pain français. Il serait intéressant de préciser l'importance relative de ces différents systèmes aussi bien sur la destruction de pigments caroténoïdes que sur leur rôle dans les phénomènes rhéologiques au cours du pétrissage.

Reçu pour publication en mai 1978.

Remerciements

Je tiens à remercier M. R. DRAPRON, Ingénieur à l'I.N.R.A. et M. B. LAUNAY, Maître Assistant à l'E.N.S.I.A. pour les discussions nombreuses que nous avons eues. Les farines de blé ont été fournies par les Grands Moulins de Paris.

Summary

Effects of some parameters on destruction of soft wheat flour carotenoid pigments during mixing

Some parameters which affect carotenoïd pigments destruction during mixing of bread wheat dough have been studied. The higher is the duration and intensity of mixing and hydration the higher is the amount of pigment destruction. This destruction is mainly due to the lipoxygenase present in wheat flour. This enzyme which acts on polyunsatured fatty acids, causes the dough bleaching by coupled oxidation of carotenoïd pigments. It is shown that when one per cent of horse bean flour, rich in lipoxygenase, or an equal quantity of horse bean or soybean purified lipoxygenase is added to wheat flour the rate of pigment destruction in dough is increased. Ascorbic acid, hydrogen peroxide and BHT which are inhibitors of the lipoxygenase-polyunsatured fatty acids system, decrease the proportion of oxidized carotenoïds during mixing. It seems that lipoxygenase is not inhibited by hydrogen peroxide which could possibly be formed during ascorbic acid oxidation in dehydroascorbic acid, because, adding catalase in model systems or horseradish peroxidase in wheat dough does not affect the inhibitory power of ascorbic acid. A protective effect on pigment oxidation is observed for sodium chloride and discussed. Besides lipoxygenase, horseradish peroxidase, when added to wheat dough, is able to increase destruction rate of carotenoïd pigments. The mechanism by which it acts is probably also a coupled oxidation of pigments similar to that observed with lipoxygenase.

Key Words: *Wheat — Flour — Carotenoïd — Destruction — Mixing.*

Références bibliographiques

BEAUX Y., DRAPRON R., NICOLAS J., CAILLAT J. M., 1973. La lipoxygènase de la fève (*Vicia faba* L.) I. Isolement. *Biochimie*, **55**, 253-262.

BERGER M., GRANDVOINNET P., 1977. Communication personnelle.

BLOKSMA A. H., 1971. In POMERANZ Y., *Wheat chemistry and technology*, Vol. 3, 523-584, 2nde éd., AACC Inc., Saint-Paul.

CHEN K. T., GEDDES W. R., 1945. *Studies on the wheat pigments*, M. Sc. Thesis, Univ. Minnesota, Saint-Paul, Minn. Cité par FORTMANN K. L., JOINER R. R., 1971. In POMERANZ Y., *Wheat chemistry and technology*, Vol. 3, 493-522, 2nde éd., AACC Inc., Saint-Paul.

C.N.E.R.N.A., Journées scientifiques du, 1962. *La qualité du pain*. Vol. 2, C.N.R.S. Éd., Paris.

COLAS A., CHARGELEGUE A., 1974. Activités lipasique et lipoxygénasique des blés et produits de mouture. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 323-334.

DANIELS N. W. R., WOODS P. S., RUSSELL EGGITT P. W., COPPOCK J. B. M., 1970. Studies on the lipids of flour. 5. Effect of air on lipid binding. *J. Sci. Fd Agric.*, **21**, 377-384.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEFFROY J., 1971. Sur l'oxydation enzymatique des tocophérols et des pigments caroténoïdes au cours de la panification. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, février 1971, 245-251.

DRAPRON R., 1972. Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. *Ann. Technol. Agric.*, **21**, 487-499.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEFFROY J., ADRIAN J., 1974. Répercussions de l'action de la lipoxygénase en panification. Destruction des acides gras essentiels à l'état libre, des caroténoïdes et des tocophérols, altération du goût du pain. *Ann. Techn. Agric.*, **23**, 353-365.

EGMOND M. R., FINAZZI AGRO A., FASELLA P. M., VELDINK G. A., VLIEGENTHART J. F. G., 1975. Changes in the fluorescence and absorbance of lipoxygenase I induced by 13_{Ls}-hydroperoxylinoleic acid and linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 43-49.

ERIKSSON C. E., OLSSON P. A., SVENSSON S. G., 1971. Denatured hemoproteins as catalysts in lipid oxidation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **48**, 442-447.

ÉTIENNE J. J., DUBOIS M., 1974. Répercussions de la lipoxygénase de la fève sur les caractéristiques des pâtes et du pain. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 335-351.

FARRE-ROVIRA R., COSTES C., 1974. Les caroténoïdes des farines et semoules de blé. *Physiol. Végét.*, **12**, 251-288.

FRAZIER P. J., LEIGH-DUGMORE F. A., DANIELS N. W. R., RUSSELL EGGITT P. W., COPPOCK J. B. M., 1973. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour dough. *J. Sci. Fd Agric.*, **24**, 421-436.

FRAZIER P. J., BRIMBLECOMBE F. A., DANIELS N. W. R., RUSSELL EGGITT P. W., 1977. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of doughs from fat extracted and reconstituted wheat flours. *J. Sci. Fd Agric.*, **28**, 247-254.

GRAVELAND A., 1970 *a*. Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol-I-monolinoleate in doughs and flour-water suspensions. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **47**, 352-361.

GRAVELAND A., 1970 *b*. Modification of the course of the reaction between wheat flour lipoxygenase and linoleic acid due to adsorption of lipoxygenase on glutenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 427-434.

GUILLEMET R., SONNTAG G., GUILBOT A., 1945. L'action des oxydants sur les protéides de la farine de blé. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **27**, 341-346.

GUINET R., 1974. Lipoxygénase et pain français. Nature et évolution du goût du pain français. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 385-389.

GUSS P. L., RICHARDSON T., STAHMANN M. A., 1968. Oxidation of various lipid substrates with unfractionated soybean and wheat lipoxidase. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 272-276.

HAWTHORN J., TODD J. P., 1955. Some effects of oxygen on the mixing of bread doughs. *J. Sci. Fd Agric.*, **6**, 501-511.

HOLMAN R. T., 1947. Crystalline lipoxidase. II. Lipoxidase activity. *Arch. Biochem.*, **15**, 403-413.

IRVINE G. N., WINKLER C. A., 1950. Factors affecting the color of macaroni. II. Kinetic studies of pigment destruction during mixing. *Cereal Chem.*, **27**, 205-218.

IRVINE G. N., ANDERSON J. A., 1953. Kinetic studies of the lipoxidase system in wheat. *Cereal Chem.*, **30**, 247-255.

IRVINE G. N., BUSHUK W., ANDERSON J. A., 1954. Kinetic studies of the catalase system of wheat. *Cereal Chem.*, **31**, 256-266.

IRVINE G. N., 1971. In POMERANZ Y., *Wheat chemistry and technology*, Vol. 3, 777-796, 2nde éd., AACC Inc., Saint-Paul.

JEANJEAN M. F., KOBREHEL K., FEILLET P., 1975. Purification et caractérisation de deux peroxydases de blé dur. *Biochimie*, **57**, 145-153.

KIES M. W., HAINING J. L., PISTORIUS E. K., SCHROEDER D. H., AXELROD B., 1969. On the question of the identity of soybean lipoxidases and carotene oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 312-315.

LAIGNELET B., KOBREHEL M., FEILLET P., 1972. Le problème de la coloration des pâtes alimentaires. *Indus. Agricol. Aliment.*, **89**, 413-427.

MATSUO R. R., BRADLEY J. W., IRVINE G. N., 1970. Studies on pigment destruction during spaghetti processing. *Cereal Chem.*, **47**, 1-5.

MECHAM D. K., WEINSTEIN N. E., 1952. Lipid binding in doughs. Effects of dough ingredients. *Cereal Chem.*, **29**, 448-455.

MENGER A., 1964. Uber die Beeinflussung der Tiegwarenfarbe durch Verlust und Neubildung von Pigmenten wahrënd der herstellung. *Getreide Mehl.*, **8**, 85.

MILATOVIC L., 1967. *In La vitamina C nella technologia dei cereali*, Éd. Tecnica Molitoria, Pinerolo.

MILLER B. S., KUMMEROW F. A., 1948. The disposition of lipase and lipoxidase in baking and the effect of their reaction products on consumer acceptability. *Cereal Chem.*, **25**, 391-398.

MITSUDA H., YASUMOTO K., YAMAMOTO A., 1967. Inactivation of lipoxygenase by hydrogen peroxide, cysteine and some other reagents. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 853-860.

NICOLAS J., 1977. Résultats non publiés.

NICOLAS J., DRAPRON R., 1977 *a*). Some physicochemical characteristics of horse bean lipoxygenase (*Vicia faba* L.). *Ann. Technol. agric.*, **26**, 119-132.

NICOLAS J., DRAPRON R., 1977 *b*). Nordihydroguaiaretic acid and butylated hydroxytoluene as inhibitors of purified lipoxygenase from horse bean (*Vicia faba* L.). *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **54**, 284-288.

POMERANZ Y., TAO R. P. C., HOSENEY R. C., SHOGREN M. D., FINNEY K. F., 1968. Evaluation of factors affecting lipid binding in wheat flours. *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 974-978.

SIDDIQI A. M., TAPPEL A. L., 1957. Comparison of some lipoxidases and their mechanism of action. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **34**, 529-533.

SUMNER J. B., SUMNER R. J. 1940. The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *J. Biol. Chem.*, **134**, 531-533.

TAPPEL A. L., 1962. In SCHULTZ H. W., DAY E. A., SINNHUBER R. O., *Lipids and their oxidation*, 122-138, Avi Publish. Co., Westport.

TSEN C. C., HLYNKA I., 1962. The role of lipids in oxidation of doughs. *Cereal Chem.*, **39**, 209-219.

TSEN C. C., LEVI I., HLYNKA I., 1962. A rapid method for the extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem*, **39**, 195-203.

WALSH D. E., YOUNGS V. L., GILLES K. A., 1970. Inhibition of durum wheat lipoxidase with L-ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **47**, 119-125.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 715-737.

Mise au point bibliographique

Mécanismes et enzymes dans la biosynthèse de la morphine

Annette MOURANCHE et Claude COSTES

Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysiologie,
Institut National Agronomique Paris-Grignon, Centre de Paris
16, rue Claude-Bernard, 75005 Paris

Résumé

La connaissance de la biosynthèse des alcaloïdes a beaucoup progressé ces vingt dernières années essentiellement grâce à l'utilisation des précurseurs marqués, celle de la morphine chez *Papaver somniferum* est l'une des mieux étudiées. Après un rappel des données acquises sur la question, cette mise au point présente les voies explorées récemment ainsi que celles qui gagneraient à être développées pour permettre une meilleure connaissance des mécanismes et des sites de biosynthèse de la morphine, ainsi que du rôle des alcaloïdes dans les plantes. Ainsi en est-il du rôle de la (±)-réticuline dans la différenciation des voies métaboliques des alcaloïdes chez *Papaver*, de l'exploration systématique des enzymes impliquées, du rôle des vésicules du latex dans la biosynthèse et la biodégradation de la morphine, de la production d'alcaloïdes par les cultures de tissus de Pavots.

Mots-clés : *Alcaloïdes — Morphine — Codéine — Thébaïne — Biosynthèse — Enzymes — Pavots — Cultures cellulaires — Polyphénoloxydases — Méthyltransférases — Amino-transférases.*

Introduction

On connaît l'importance des besoins en morphine et en codéine de l'industrie pharmaceutique; la diminution, voire la suppression, de la culture du Pavot à opium dans plusieurs pays orientaux dans le cadre de la lutte mondiale contre les stupéfiants entraîne la disparition d'une source importante d'approvisionnement.

En effet, si l'on sait maintenant réaliser la synthèse de ces molécules, le prix de revient n'est actuellement pas compétitif avec celui de l'extraction de la morphine du Pavot.

Pour faire face à cette situation, de nombreux programmes de recherche sont en cours dans des domaines variés :

— recherche de variétés nouvelles adaptées aux climats tempérés;

— analyse du capital génétique des variétés productrices de morphine et de thébaïne;

— approfondissement des connaissances sur le métabolisme de la morphine dans la plante;

— développement des cultures de tissus.

Il paraît opportun, dans ce contexte, de faire le point sur l'état actuel de la connaissance du métabolisme de la morphine et de tenter de dégager les voies vers lesquelles de nouvelles recherches pourraient s'orienter avec profit. D'autant plus qu'il n'existe pas de mise au point en langue française sur ce sujet et que les revues parues sont déjà anciennes ou très ponctuelles (Brochmann-Hanssen, 1971; Mothes et Schutte, 1963; Robinson, 1968; Santavy, 1970; Spencer, 1968).

Après un bref aperçu sur les alcaloïdes du genre *Papaver*, on trouvera la description de la biosynthèse de la morphine admise actuellement chez *Papaver somniferum* et les voies récemment explorées sur sa dégradation dans la plante. On verra qu'un nombre assez limité des enzymes concernées a été étudié et que les sites de biosynthèse intracellulaire sont encore mal connus. Enfin les cultures de tissus ne montrent pas pour le moment d'aptitude particulière à synthétiser la morphine.

I. — Les alcaloïdes de type morphinane du genre *Papaver*

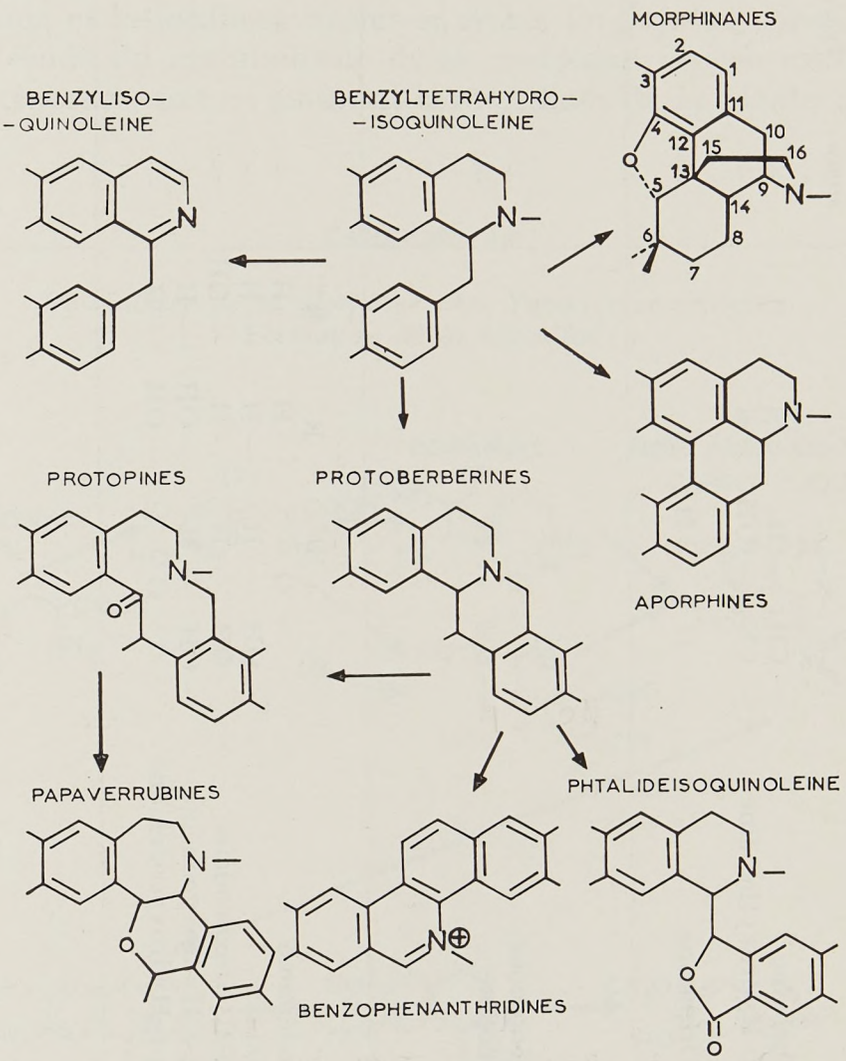
Les alcaloïdes se caractérisent par une très grande diversité et un taux généralement assez faible dans les plantes qui en contiennent. On estime que 15 p. 100 des plantes environ contiennent des alcaloïdes et la part d'azote dérivée vers leur biosynthèse est toujours très faible, moins de 1 à 2 p. 100 en général. La morphine est la première base végétale caractérisée comme telle (d'où le nom d'alcaloïde). Isolée en 1805 à partir de l'opium du Pavot, sa structure a été élucidée dès 1925. Du fait de leurs propriétés analgésiques et euphorisantes, les alcaloïdes du genre *Papaver* des Papaveraceae ont été largement inventoriés.

Le genre *Papaver* comprend une centaine d'espèces (Santavy, 1970) parmi lesquelles deux ont été particulièrement étudiées pour leur production d'alcaloïdes à squelette morphinane : *Papaver somniferum* et *Papaver bracteatum*. La morphine a été détectée dans deux espèces seulement : *P. setigerum*, à l'état de traces, et *P. somniferum*, où elle s'accumule en quantité variable suivant les variétés. L'opium, latex séché du Pavot à opium, en contient 10 à 20 p. 100. Les capsules de l'Oeillette, seule variété cultivée en France, en contiennent de 0,2 à 0,6 p. 100. *Papaver bracteatum* ne produit pas de morphine mais accumule des quantités notables de thébaïne, le premier précurseur de la morphine à squelette morphinane. Une variété d'Iran (Arya II) accumule plus de 60 p. 100 de thébaïne dans le latex déshydraté (Ping Chuang Cheng, 1972). Aucune espèce accumulant de la codéine, précurseur direct de la morphine, ne semble avoir été isolée.

La majorité des alcaloïdes du genre *Papaver* dérivent d'acides aminés aromatiques, en particulier la tyrosine, dont deux dérivés se condensent en un noyau benzyltétrahydroquinoléine, qui se différencie ensuite en huit familles principales. Le tableau 1 présente les squelettes de ces familles d'alcaloïdes du genre *Papaver* et leurs relations biosynthétiques.

TABLEAU I

Squelette de principales familles d'alcaloïdes du genre Papaver



Une quarantaine d'alcaloïdes ont été identifiés chez *P. somniferum* et un-vingtaine chez *P. bracteatum*. La majorité des alcaloïdes de *P. somniferum* appare tiennent aux familles benzylisoquinoléine, aporphine et morphinane. Le groupe morphinane lui-même comporte assez peu d'alcaloïdes localisés essentiellement chez *P. somniferum*, *P. bracteatum* et *P. orientale*. Le tableau 2 récapitule les différents alcaloïdes de type morphinane identifiés à ce jour chez *P. somniferum* et *P. bracteatum*. A côté des trois alcaloïdes majeurs, thébaïne, codéine, morphine, plusieurs autres ont été détectés. La présence de l'un d'entre eux, la 10-hydroxycodéine, a été contestée et attribuée à des artefacts (Kuhn et Pfeifer, 1963). Seules sont indiquées dans ce tableau les références postérieures à 1970; on peut se référer pour les autres à Santavy, 1970.

TABLEAU 2

Alcaloïdes du groupe morphinane isolés chez Papaver somniferum *et* Papaver bracteatum

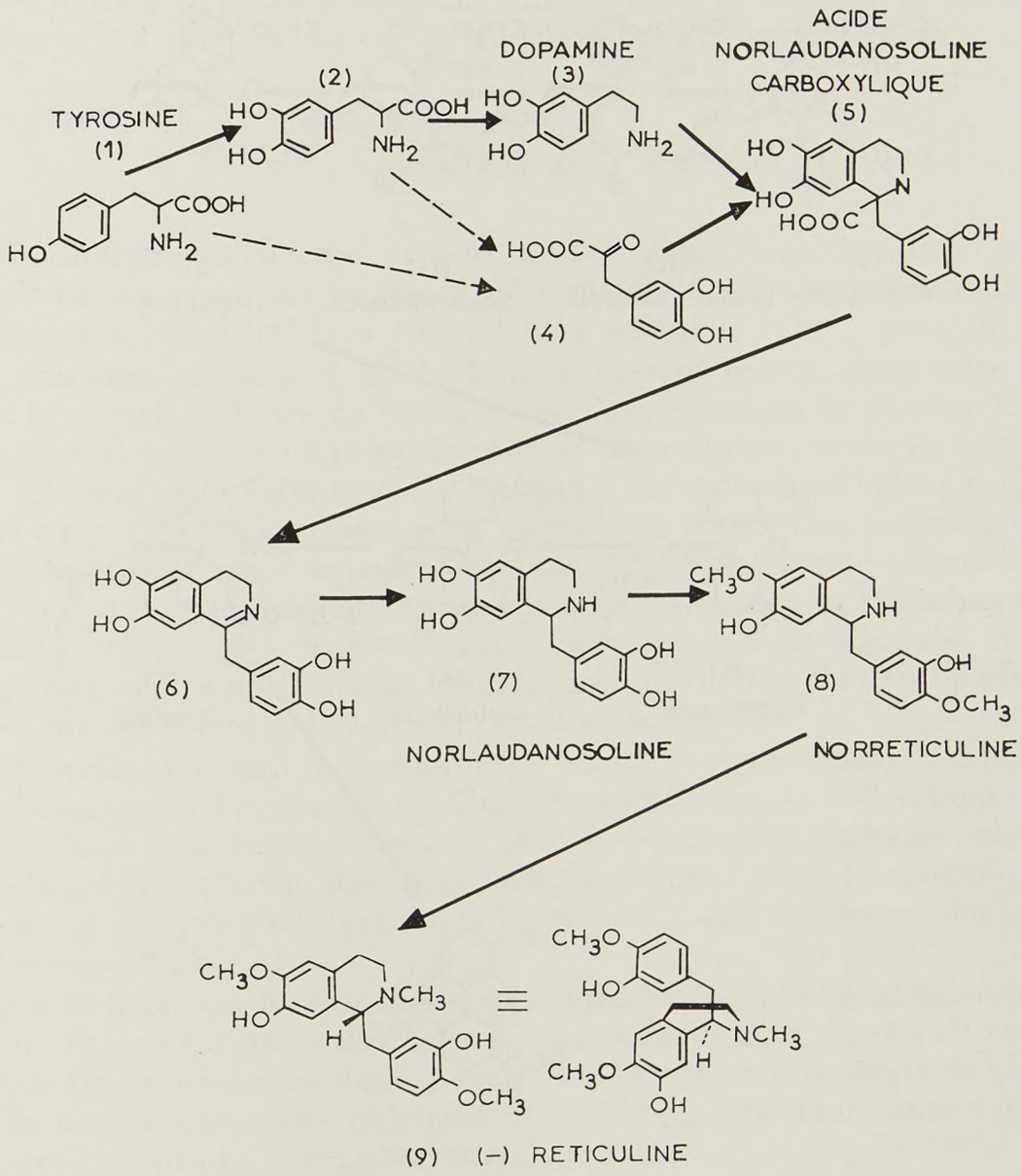
						Papaver somn.	*Papaver bract.*	
		R	R′					
	I : Thébaïne	— CH_3	— H			+	++	
	II : 16-Hydroxythébaïne	— CH_3	— OH			+	—	BROCHMANN-HANSSEN (1971)
	III : Oripavine	— H	— H			—	+	
		R	R′					
	IV : Néopinone	= O				+	—	PARKER *et al.* (1972)
	V : Néopine	— OH	— H			+	+	KUPPERS *et al.* (1976)
		R	R′	R″	R‴			
	VI : Codéinone	= O		— H	— H	+	—	
	VII : Codéine	— OH	— H	— H	— H	+	+	KUPPERS *et al.* (1976)
	VIII : 10-Hydroxycodéine	— OH	— H	— H	— OH	+	—	
	IX : 14-β-Hydroxycodéine	— OH	— H	— OH	— H	—	+	THEUNS *et al.* (1977)
	X : 14-β-Hydroxycodéinone	= O		— OH	— H	—	+	THEUNS *et al.* (1977)
		R						
	XI : Morphine	— CH_3				++	—	
	XII : Normorphine	— H				+	—	MILLER *et al.* (1973)

II. — Biosynthèse de la morphine chez *Papaver Somniferum*

La biosynthèse de la morphine semble maintenant assez bien élucidée à la suite de nombreux travaux effectués depuis une vingtaine d'années. Ce sont des chimistes organiciens qui ont mené à bien la majorité des travaux concernant la biosynthèse des alcaloïdes. Les résultats acquis sont remarquablement homogènes, bien que certaines méthodes utilisées dans la reconnaissance des métabolites intermédiaires puissent être critiquées par des biochimistes ou des physiologistes. On peut regretter en particulier que très peu de travaux aient été entrepris et publiés sur l'identification et la localisation des enzymes impliquées dans ces chaînes de biosynthèse. L'étude du métabolisme de la morphine repose exclusivement sur l'utilisation de traceurs, soit en assurant la croissance de la plante dans un milieu

TABLEAU 3A

Biosynthèse de la morphine chez Papaver somniferum
Formation de la réticuline



marqué, soit en incorporant artificiellement des précurseurs dans les organes du végétal (absorption par feuilles coupées, injection locale, alimentation par mèche...). L'injection de précurseurs peut entraîner une altération du métabolisme normal par l'accumulation locale de substrat qu'elle provoque, alors que l'exposition à $^{14}CO_2$ respecte davantage le métabolisme biosynthétique. Les résultats obtenus par les deux types de méthodes sont en bon accord et le schéma métabolique qui s'en dégage est présenté dans les tableaux 3A et 3B.

Quatre étapes peuvent être distinguées dans la biosynthèse de la morphine :

— la condensation de deux dérivés de la tyrosine formant un noyau benzyl-tétrahydroquinoléine, la norlaudanosoline (7);

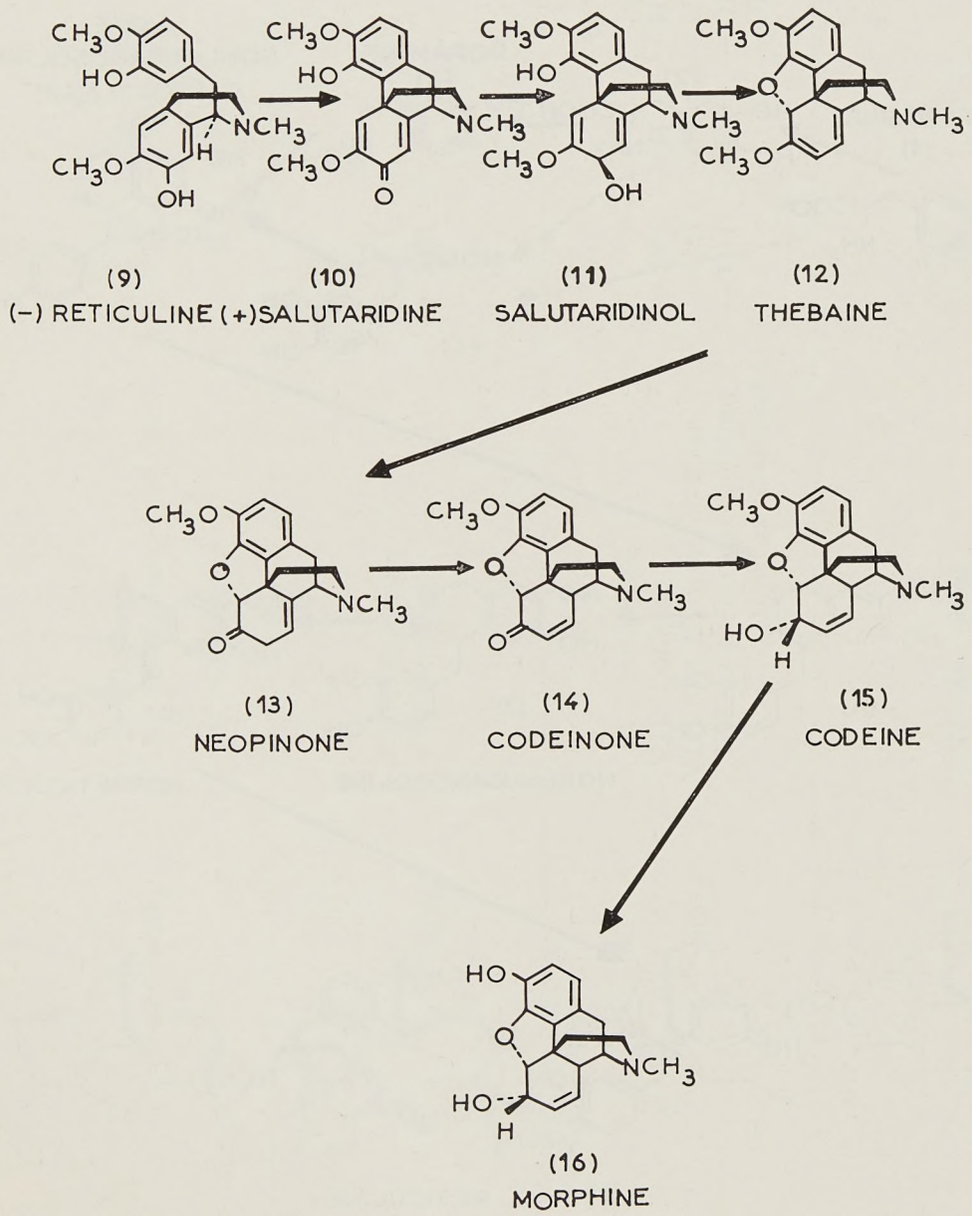
— la méthylation de la norlaudanosoline en réticuline (9);

— le couplage oxydatif des fonctions phénol, aboutissant à la formation du premier noyau morphinane, la thébaïne (12);

— la déméthylation réductrice de la thébaïne en morphine (16).

TABLEAU 3B

Biosynthèse de la morphine chez Papaver somniferum
Transformation réticuline → thébaïne → morphine



1. — *Formation de la norlaudanosoline*

Il est maintenant bien établi que le précurseur de la morphine chez *P. somniferum* est la tyrosine (1). Celle-ci est issue de la protéolyse des réserves protéiques chez les semences en germination (KOVACS, 1975), puis provient ensuite du métabolisme de l'acide shikimique. L'un des dérivés de la tyrosine qui concourt à la formation du noyau benzyltétrahydroquinoléine a été identifié assez tôt. Il s'agit de la dopamine (3), précurseur d'un seul des deux noyaux aromatiques. On a longtemps supposé, sans support expérimental convaincant, que le deuxième dérivé pourrait être soit le 3-4 dihydroxyphénylacétaldéhyde, soit le 3-4 dihydroxyphénylpyruvate. Les derniers travaux conduits sur *P. somniferum* (BATTERSBY *et al.*, 1975) et sur *P. orientale* (WILSON et COSCIA, 1975) tendraient à prouver qu'il s'agit du dérivé pyruvate (4). En effet, l'acide norlaudanosoline carboxylique (5) a été isolé chez *P. somniferum* et des expériences *in vitro* montrent qu'il ne peut se former qu'à partir du dérivé pyruvate. Par ailleurs, cet acide aminé (5) se révèle un précurseur efficace de la norlaudanosoline, aussi bien dans les capsules vivaces de *P. somniferum* que dans les plantules et le latex de *P. orientale*. Cet acide aminé (5) serait ensuite décarboxylé en imine (6) qui serait réduite en norlaudanosoline (7), premier précurseur de ce type incorporé en morphine (BATTERSBY et BINKS, 1960) : ces étapes, encore hypothétiques, sont introduites à la suite de la découverte de l'existence et du rôle de l'acide norlaudanosoline carboxylique (5).

2. — *Formation de la réticuline*

La méthylation s'effectue en deux étapes. Deux o-méthylations conduisent à la norréticuline (8) qui est un bon précurseur de la morphine (BATTERSBY *et al.*, 1964), puis une N-méthylation conduit à la réticuline (9).

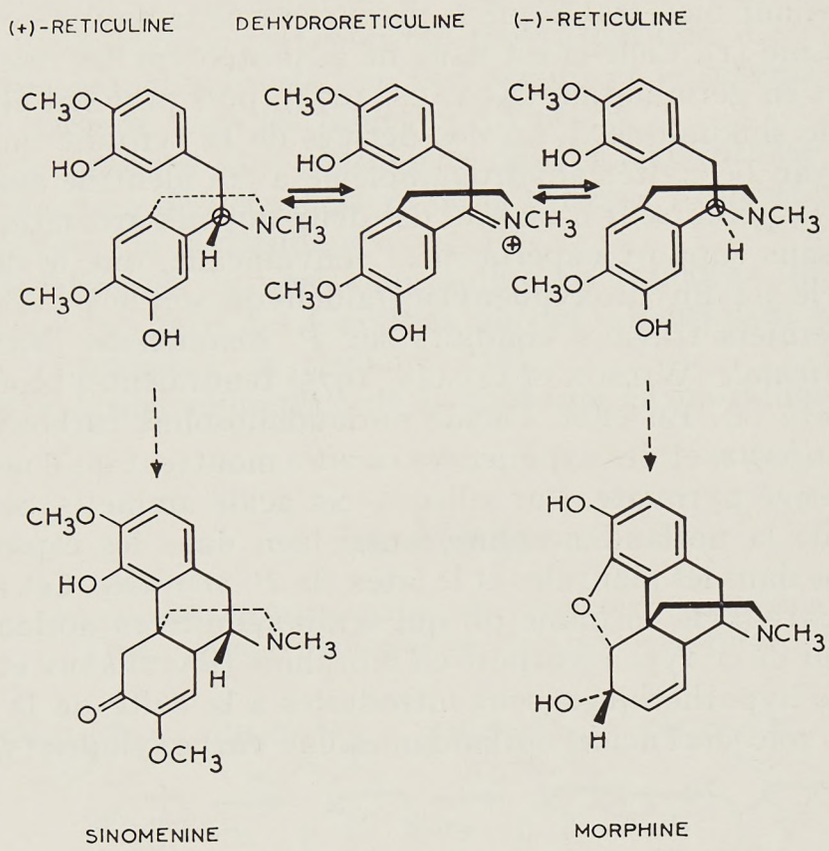
La réticuline est le seul alcaloïde actuellement connu, dans cette série, qui présente la propriété de conduire à une racémisation dans la plante. En effet, si les deux énantiomères sont présents chez *P. somniferum*, seule la (—)-réticuline conduit à la morphine (BARTON *et al.*, 1965). L'incorporation partielle de (+)-réticuline au cours de la biosynthèse de la morphine a été justifiée par une interconversion des deux énantiomères par l'intermédiaire d'une forme déhydro-réticuline (tabl. 4) qui donne un meilleur taux d'incorporation que la réticuline elle-même (BATTERSBY *et al.*, 1965). Une telle interconversion n'a pas été mise en évidence entre les deux énantiomères de la norlaudanosoline, bien qu'il ne soit pas impossible qu'un tel intermédiaire existe (BATTERSBY *et al.*, 1968).

La réticuline pourrait jouer un rôle de plaque tournante dans la différenciation du métabolisme des Papaveraceae. Chez *P. somniferum*, la (—)-réticuline conduit aux alcaloïdes à squelette morphinane et la (+)-réticuline à tous les autres groupes d'alcaloïdes, à l'exclusion des benzylisoquinoléines. La (+)-réticuline conduit par ailleurs à la protopine chez *Dicenta spectabilis* et à la sinoménine chez *Sinomenum acutum* (tabl. 4).

Le cas de la biosynthèse de sinoménine à partir de (+)-réticuline est intéressant à signaler. En effet, cette voie ne semble pas exister chez *P. somniferum*. Or des cultures de tissus provenant de *P. somniferum* produisent un alcaloïde qui pourrait être de la sinoménine, alors qu'aucun alcaloïde de type morphinane n'a pu être détecté avec certitude (BELLIARD, 1974).

TABLEAU 4

Interconversion entre les deux énantiomères de la réticuline



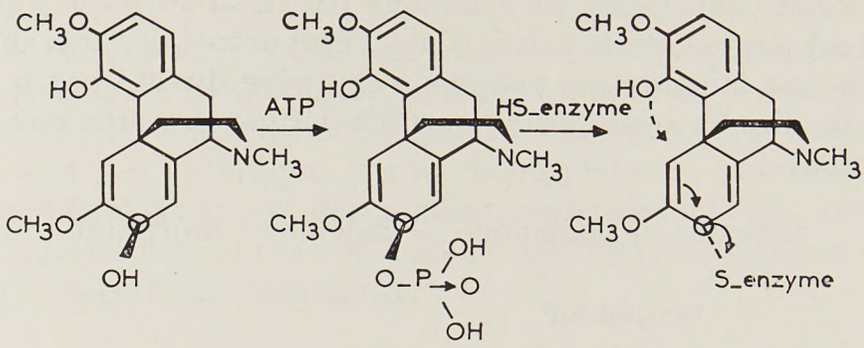
3. — *Formation de la thébaïne*

Deux intermédiaires ont été identifiés, une diénone, la (+)-salutaridine (10) et l'alcool correspondant, le salutaridinol (11). Le mécanisme de la série des réactions strictement stéréospécifiques qui aboutissent à la fermeture des deux cycles formant le squelette morphinane n'a pas encore été élucidé. L'hypothèse communément admise est celle d'un couplage oxydatif des fonctions phénol libres (Robinson, 1968). Les étapes de méthylation revêtent de ce fait une importance capitale. D'une part, la N-méthylation permettrait d'éviter une compétition dans les réactions d'oxydation, d'autre part les sites d'O-méthylation détermineraient les lieux de couplage, alors qu'une méthylation complète empêcherait toute fermeture de cycle ultérieure. Les différentes voies métaboliques des alcaloïdes pourraient provenir de la spécificité de leurs systèmes enzymatiques de méthylation, alors que les polyphénoloxydases pourraient être largement non spécifiques.

La réduction stéréospécifique du groupe carbonyle de la salutaridine conduit au salutaridinol-I dont la configuration sur le carbone 7 n'est pas favorable au mécanisme retenu actuellement pour la formation du cycle furane, un déplacement nucléophile direct S_N2'. L'intervention d'une phosphorylation enzymatique en C_7 a été envisagée; le déplacement du groupe phosphate par une enzyme de type SH pourrait ensuite inverser la configuration en C_7 et permettre le déplacement direct S_N2' (Leete, 1969). Bien que l'ATP et le NADP soient des cofacteurs indispensables à la transformation de (—)-réticuline en thébaïne par un système cellulaire extrait de plantules de *P. somniferum* (Rapoport, 1966), cette hypothèse n'a jamais été vérifiée expérimentalement (tabl. 5). Les complexes polyphénoloxydases

TABLEAU 5

Inversion enzymatique de la configuration en C_7 du salutaridinol I



étudiés actuellement chez *P. somniferum* ne pourraient intervenir dans un mécanisme de ce type (ROBERTS, 1971).

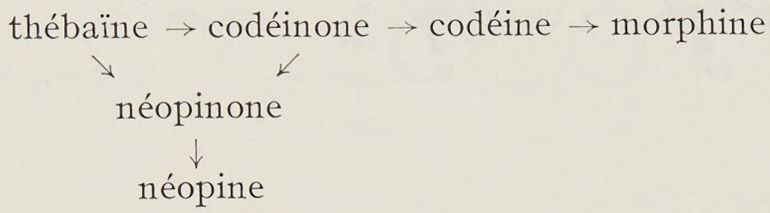
Des travaux récents effectués chez *P. bracteatum* (HODGES *et al.*, 1977) permettent de supposer que la biosynthèse de la thébaïne suit une voie métabolique identique à celle qui est décrite ici chez *P. somniferum*. En effet, la 1,2-déhydroréticuline et la réticuline marquées sont bien incorporées pour former de la réticuline et de la thébaïne. La thébaïne marquée est également incorporée et métabolisée. Mais ni celle-ci, ni les précurseurs post-thébaïne de la morphine ne conduisent à la formation de morphine chez *P. bracteatum*.

4. — *Formation de la morphine*

Les O-déméthylations successives irréversibles qui correspondent à la séquence thébaïne → codéine → morphine ont été mises en évidence assez tôt à l'aide de traceurs (RAPOPORT *et al.*, 1960). L'existence d'intermédiaires probables entre la thébaïne et la codéine a été envisagée par BARTON dès 1957 : néopinone (IV), codéinone (VI), codéine-méthyl-éther (XI) (voir tabl. 2 et 7). La codéinone et la codéine-méthyl-éther sont incorporées en morphine avec un bon rendement (BATTERSBY et MARTIN, 1967; BLASCHKE *et al.*, 1967), ce qui laissait supposer deux voies possibles pour la conversion de thébaïne en morphine, l'une par la codéine-méthyl-éther lorsque la réduction a lieu en premier, l'autre par la codéinone lorsque la déméthylation a lieu en premier. Les derniers travaux effectués à ce sujet ont tranché définitivement la question (PARKER *et al.*, 1972). Ils reposent sur des expériences de marquage avec *P. somniferum*, soit exposé pendant quelques heures à un taux constant de $^{14}CO_2$, soit alimenté par les racines en précurseur marqué. L'incorporation de codéinone (14) et de codéine-méthyl-éther est confirmée et celle de néopinone (13) est mise en évidence. Mais si la codéinone et la néopinone sont des constituants naturels de *P. somniferum*, la codéine-méthyl-éther n'a jamais pu être détectée. Son incorporation et sa conversion en codéine pourrait résulter d'une voie anormale sous l'action d'enzymes de déméthylation non spécifiques. En effet, la spécificité de ces enzymes semble s'étendre à un certain nombre de dérivés de la codéine comme des travaux originaux discutés plus loin (KIRBY *et al.*, 1972) le laissent présager.

C'est la première fois que la néopinone est détectée chez *P. somniferum*. Ce corps, particulièrement instable, se réarrange spontanément en codéinone en solution. Comme les compartiments de ces deux corps sont approximativement iden-

tiques au cours des expériences de marquage par $^{14}CO_2$, il est raisonnable de penser que la thébaïne est d'abord déméthylée en néopinone (13) qui s'isomérise spontanément en codéinone (14), celle-ci étant enfin réduite en codéine (15). Les enzymes responsables de cette succession de réactions irréversibles n'ont jamais été mises en évidence. Il est impossible de savoir, dans l'état actuel des travaux, si cette voie par la néopinone est mineure par rapport à une voie directe par la codéinone. La néopine présente chez *P. somniferum* pourrait dériver de cette voie mineure selon le schéma suivant :



L'incorporation de thébaïne, de codéinone et de codéine marquées a montré que la seule transformation effectuée chez *P. bracteatum* est la réduction de codéinone en codéine (Hodges *et al.*, 1977). Cette réduction est assez proche de celle de la salutaridine et pourrait être effectuée par la même oxydo-réductase. L'absence d'activité enzymatique d'O-déméthylation chez *P. bracteatum* conforte l'hypothèse du rôle prédominant des méthyltransférases dans la différenciation des voies métaboliques des alcaloïdes chez *Papaver*.

III. — Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la morphine

Peu de biochimistes se sont intéressés jusqu'à présent à la biosynthèse des alcaloïdes, ce qui explique sans doute que très peu d'études approfondies aient été entreprises et publiées sur les systèmes enzymatiques impliqués dans la biosynthèse de la morphine. Une mise au point a été publiée sur la question (Leete, 1969) constatant cette lacune : la situation n'a pas beaucoup évolué depuis, malgré quelques études sur les polyphénoloxydases et les aminotransférases. On peut espérer que les progrès récents dans les techniques de séparation et de dosage des alcaloïdes permettront d'entreprendre des études enzymologiques plus approfondies. Parmi ces techniques, on peut citer la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) : en dix minutes, avec un solvant approprié, on peut effectuer par HPLC la séparation quantitative d'alcaloïdes aussi voisins que la thébaïne, la codéinone, la codéine et la morphine (non publié). Cette technique est sensible puisqu'elle permet un seuil de détection de 50 ng de thébaïne ou 3 p.p.m. dans les extraits de *P. bracteatum* (Wu et Dobberstein, 1977).

Pour avancer maintenant dans la compréhension de certains mécanismes réactionnels, déterminer les voies métaboliques en compétition, localiser les sites intracellulaires de biosynthèse, comparer le potentiel génétique de différentes variétés, une étude systématique des enzymes impliquées dans la chaîne de biosynthèse de la morphine semble absolument nécessaire. Elle permettrait de répondre à des questions fondamentales. Où et quand s'effectuent les décarboxylations et les transferts de — NH_2 et de — CH_3 ? La différenciation des voies métaboliques des alcaloïdes reflète-t-elle la différence de spécificité de leurs polyphénoloxydases et/ou de leurs méthyltransférases ? L'existence de complexes multienzymatiques

liés à des organites cellulaires rend-elle improbable l'obtention de variétés capables d'accumuler certains métabolites intermédiaires qui, normalement, n'ont qu'une existence fugace ?

Le tableau 6 récapitule les propriétés des enzymes étudiées chez *P. somniferum*. Certaines d'entre elles concernent la biosynthèse de la morphine proprement dite, d'autres sont relatives au métabolisme général. La mise en évidence de la plupart de ces enzymes résulte simplement de la mise en œuvre d'un test enzymatique éprouvé, et souvent peu spécifique, sur un homogénat de plantules ou de latex. Seules des polyphénoloxydases, des aminotransférases et des aminopeptidases ont été partiellement fractionnées et aucune des enzymes citées n'a été purifiée jusqu'à activité spécifique constante.

1. — *Les polyphénoloxydases*

Les polyphénoloxydases revêtent une importance considérable pour la formation du noyau morphinane. Elles interviennent dans les étapes de transformation de monophénols en diphénols, puis dans les couplages oxydatifs des ortho-diphénols permettant les réactions de condensation.

La première activité enzymatique de ce type a été détectée dans les racines de plantules de *P. somniferum* (Jindra, 1966) où le taux d'activité de la dopa-oxydase est en relation directe avec la formation des alcaloïdes de type morphinane au cours de la germination. Les polyphénoloxydases ont été partiellement purifiées à partir de divers organes de la plante (Asghar et Siddiqi, 1970) et à partir du latex des capsules (Roberts, 1971 et 1974).

Dans la plante, l'activité polyphénoloxydase est distribuée dans tous les homogénats des organes qui ont été essayés : racines, tiges, feuilles, fruits et bourgeons où la plus forte activité est détectée. L'activité spécifique est multipliée par 32 à la suite d'une série de fractionnements : poudre acétonique, précipitation au sulfate d'ammonium, puis chromatographie sur CM-cellulose et sur DEAE-cellulose. Les acides aminés aromatiques, en particulier la tyrosine, sont inactifs alors que les substrats suivants montrent une activité dont le K_M est donné (en μM) : tyramine (2,2), dopa (1,5), dopamine (1,3), catéchol (2,2), p-crésol (2,4). Le cuivre semble un effecteur indispensable à l'activité enzymatique et les agents chelatants Cu^{2+} inhibent fortement la réaction.

Dans le latex, l'activité polyphénoloxydase est entièrement concentrée dans les vésicules qui sédimentent à 1 000 g. Cette observation est en accord avec le fait que ces vésicules isolés sont capables de synthétiser de la morphine à partir de tyrosine et de dopa (Fairbairn *et al.*, 1968b et 1970). Le complexe enzymatique montre à la fois les caractéristiques de la catéchol-oxydase et une activité laccase et tyrosinase. Dans le but d'étudier d'une manière plus approfondie l'action du complexe polyphénoxydase sur la tyrosine, une purification partielle a été entreprise afin de vérifier si les variations d'activité observées pouvaient être expliquées par la fixation sur les membranes des vésicules. L'activité spécifique a été ainsi multipliée par 20 après désintégration des vésicules, centrifugation à 10 000 g, lavage sur Sephadex G25, précipitation au sulfate d'ammonium et enfin fractionnement sur DEAE — Sephadex A25. Deux fractions actives sont partiellement séparées. Toutes les deux oxydent les substrats classiques : catéchol, para-crésol, dopa, mais une seulement oxyde la tyrosine. La fraction oxydant la tyrosine semble entièrement contenue dans le complexe enzymatique solubilisé après désintégration des vésicules par les ultrasons alors qu'une partie de l'activité polyphénoloxydase

TABLEAU 6

Enzymes étudiées chez Papaver somniferum

Enzymes étudiées	Origine	Substrats actifs	Effecteurs		Degré de purification		Références
			Coenzymes ou activateurs	Inhibiteurs	Homogénat	Fractionnement partiel	
Décarboxylases	Plantules	Phe, Tyr, Dopa		Hydroxylamine	+	—	JINDRA *et al.*, 1966
	Latex (surnageant 1 000 g/30 m)	Glu		Hydroxylamine	+	—	ANTOUN et ROBERTS, 1975a
Polyphénoloxydases	Racines plantules de 9 jours	Tyr, Dopa, p-Crésol, Catéchol	Acide L-Ascorbique	Diéthyl dithiocarbamate (DIECA)	+	—	JINDRA *et al.*, 1966
	Racines, tiges, feuilles, fruits, bourgeons	Tyramine, Dopa, Dopamine, Catéchol, p-Crésol, (Tyr inactif)	Cu^{2+}	DIECA Sodium azide Semicarbazide, Hydroxylamine, Thiourée	+	+	ASGHAR et SIDDIQI, 1970
	Latex (vésicules 1 000 g)	Tyr, Dopa, Hydroxytyramine, p-Crésol, Catéchol, Ac. p-Coumarique, Ac. Caféique, Hydroquinone		DIECA, KCN	+	+	ROBERTS, 1971 et 1974

Aminopeptidases	Plantules de 2 jours	4-Phénylazophénylamide de : Phe, Tyr, Ala, Leu, Met, et Gly			+	+	Kovacs et Besenova, 1976
Aminotransférases	Plantules	Phe, Tyr, Dopa } α-céto Glu, α-céto Asp	Phosphate de pyridoxal		+	—	Jindra *et al.*, 1966
	Plantules de 5 jours	L-Phe, L-Asp, L-Orn } α-céto Glu			+	+	Kovacs, 1970
	Latex (surnageant 1 000 g/30 m)	Asp : α-céto Glu Glu : pyruvate			+	—	Antoun et Roberts, 1975a
Méthyltransférases	*In vivo*. Injection de substrat à la plante	Codéine, Isocodéine, Dihydrocodéine, Dihydrodéoxycodéine, Bromocodéine			—	—	Kirby *et al.*, 1972
	Latex (surnageant 1 000 g/30 m)	Norlaudanosoline L-met, S-adénosyl-L-met	KCl, $MgCl_2$ ATP glutathion, Hydroxylamine, Dithiothreitrol		+	—	Antoun et Roberts, 1975[c]
Divers : Enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, de la glycolyse Enzymes associés aux peroxysomes, lysozomes et glyoxysomes Phosphatases	Latex (surnageant 1 000 g/30 m)				+	—	Antoun et Roberts, 1975a et 1975[b]

reste fixée aux membranes qui sédimentent à 10 000 g. L'activité de ces deux fractions varie durant le développement de la capsule et celle qui oxyde la tyrosine est maximale durant les 7 premiers jours. La différence de spécificité, à l'égard de la tyrosine, des polyphénoloxydases étudiées dans la plante et dans le latex n'est pas commentée par les auteurs.

2. — *Les aminotransférases*

Les aminotransférases provoquent des transferts de $-NH_2$ entre acides aminés et acides α-cétoniques. Une activité de ce type a été détectée chez les jeunes plantules de *P. somniferum* (JINDRA *et al.*, 1966) comme le laissait supposer la bonne incorporation d'acides α-cétoniques dans les alcaloïdes. Les aminotransférases de plantules de 5 jours ont été partiellement purifiées (KOVACS, 1970). Après déshydratation par l'acétone, l'extrait est fractionné sur gel Sephadex G100 donnant un chevauchement encore très prononcé des pics à activité enzymatique. Les activités spécifiques (A.S.) des substrats essayés sont multipliées par les facteurs suivants par rapport à l'extrait brut et les K_M apparents sont mesurés :

	Facteur de multiplication de A.S.	K_M(mM)
L-Phe : α-cétoglutarate aminotransférase	26,1	6,1
L-Asp : α-cétoglutarate aminotransférase	10,2	5,8
L-Ornithine : α-cétoglutarate aminotransférase . . .	15,9	3,3

La spécificité de l'accepteur de la phénylalanine est précisée. En prenant pour base 100 l'α-cétoglutarate, l'activité enzymatique tombe à 13 pour le pyruvate et devient nulle pour l'oxaloacétate et le glyoxylate.

3. — *Les méthyltransférases*

Les méthyltransférases ont sans doute une spécificité plus rigoureuse que les polyphénoloxydases et pourraient assurer la différentiation des voies métaboliques des différents alcaloïdes. Elles interviennent au cours de la méthylation de la norlaudanosoline en réticuline, puis au cours de la déméthylation de la thébaïne en codéine puis en morphine.

Un travail déjà ancien (AXELROD, 1955) montre l'existence d'une O-déméthylation de la codéine en morphine par des extraits de foie de lapin et de rat, contenant uniquement les microsomes. L'accepteur de méthyle est la nicotinamide et deux effecteurs sont nécessaires, O_2 et NADPH. Le système enzymatique déméthyle également la thébaïne et quelques dérivés de la codéine.

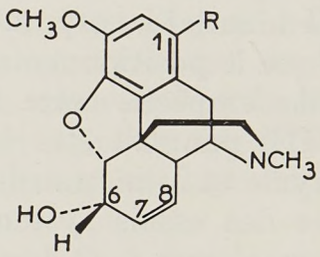
Aucune méthyltransférase n'a encore été isolée et purifiée à partir de *Papaver*, mais une activité enzymatique de transméthylation a été mise en évidence dans

le latex de *P. somniferum* (AUTOUN et ROBERTS, 1975c). L'incubation d'un mélange de L-méthionine ou S-adénosyl-L-méthionine marqués ($^{14}CH_3$) et de norlaudanosoline avec du latex a été effectuée pendant une heure à 37 °C. Les alcaloïdes ont été ensuite séparés par chromatographie en couche mince et leur radioactivité détectée par autoradiographie. Les mesures de radioactivité donnent les résultats suivants d'incorporation de $^{14}CH_3$: réticuline (245 dpm), papavérine (233 dpm), thébaïne (140 dpm), codéine (145 dpm); après centrifugation du latex à 1 000 g pendant 30 min, l'activité enzymatique est essentiellement localisée dans le surnageant. Le seul substrat utilisé est la norlaudanosoline ce qui ne permet pas de préciser si la ou les méthyltransférases mises en évidence sont spécifiques des O et N-méthylations de la norlaudanosoline ou si elles peuvent également assurer les O-déméthylations de la thébaïne en codéinone et de la codéine en morphine.

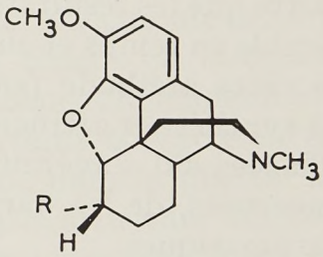
La spécificité du système enzymatique d'O-déméthylation a été étudiée de manière détournée chez *P. somniferum*. En effet, un mode d'étude assez original de la biosynthèse des métabolites dits « secondaires » se développe. Il consiste à essayer dans la plante même, la bioconversion d'analogues « non naturels » de précurseurs en produits « non naturels ». Ainsi, des dérivés de la codéine marqués au tritium (tabl. 7) ont été injectés à *P. somniferum* en même temps que de la

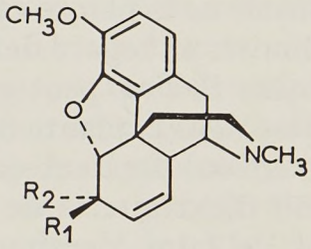
TABLEAU 7

Analogues structuraux de la codéine, substrats de déméthylases



VII : Codéine R : — H
VIII : Bromocodéine R : — Br





IX : Dihydrodeoxycodéinone R : — H
X : Dihydrocodéine R : — OH

XI : Codéine-Méthyl-Éther R_1 : — H, R_2 : — OCH_3
XII : Isocodéine R_1 : — OH, R_2 : — H

codéine (VII) marquée au carbone 14 (KIRBY *et al.*, 1972). La plante effectue à la fois l'O-déméthylation de la codéine en morphine et celle des analogues de la codéine en dérivés de morphine correspondants. La nature différente des traceurs utilisés permet de vérifier qu'il ne se produit pas de conversion entre la codéine et ses analogues et permet de mesurer l'efficacité du processus « non naturel » d'O-déméthylation par rapport à celui de la codéine. En prenant pour base 100

l'incorporation de codéine en morphine, l'efficacité des précurseurs « non naturels » essayés est la suivante (voir tabl. 7) :

— dihydrodéoxycodéine (IX) 108
— codéine-méthyl-éther (XI) 69
— dihydrocodéine (X) 47
— isocodéine (XII) 15
— 1-bromocodéine (VIII) 5,8

Ces résultats permettent aux auteurs d'émettre des hypothèses sur la spécificité et le mode d'action du système enzymatique de transméthylation de *P. somniferum*. Il est probable que l'ensemble des transméthylations ne s'effectue pas par un seul système enzymatique puisque seule la norlaudanosoline est incorporée en thébaïne parmi les 4 isomères O,O,N-triméthylés (BATTERSBY *et al.*, 1965). En revanche, la déméthylation de la thébaïne en morphine pourrait être due à une enzyme ou un système multienzymatique (ce type d'étude ne permet évidemment pas de choisir entre les deux termes de l'alternative) à spécificité confinée au squelette morphinane. Il faut cependant remarquer que si cette hypothèse est valable, la thébaïne pourrait se transformer en oripavine (III) (tabl. 2); la codéinone (VI) et la néopinone (IV) en dérivés phénols correspondants, ce qui n'a jamais été mis en évidence chez *P. somniferum*.

Par ailleurs, l'analyse de la structure des substrats « non naturels » incorporés apporte des renseignements sur le mode de fixation de l'enzyme. En effet, le fort taux d'incorporation de la dihydrodéoxycodéinone (IX) laisse supposer que ni la double liaison en 7-8, ni le groupe hydroxy en 6 n'interviennent dans la fixation du substrat sur l'enzyme. Cependant, l'incorporation plus faible de l'isocodéine (XII) pourrait laisser présager que le positionnement de ce groupe hydroxy en cis par rapport au pont éthanamine empêche cette fixation. Enfin, l'incorporation très faible du dérivé bromé (VIII) pourrait être due à un empêchement stérique au niveau du site actif de l'enzyme et à un transfert de charges défavorable.

Les auteurs suggèrent que des essais systématiques soient entrepris pour éprouver la capacité de *P. somniferum* à O-déméthyler les alcaloïdes d'autres plantes. Des résultats de cet ordre ont parfois été signalés. En particulier, des plants de *Nicotania alata* auraient mené à bien la conversion de thébaïne injectée en codéine puis en morphine (BOHM, 1966). Cependant, si ce mode d'approche du métabolisme de la plante est original, il faut reconnaître que les résultats obtenus sont assez limités en regard de l'investissement considérable en temps et en matériel qu'il implique. Si l'on peut envisager l'utilisation de cette méthode pour tenter la biosynthèse dans la plante de molécules impossibles à synthétiser artificiellement, ces bioconversions seraient évidemment bien plus efficaces s'il s'avérait possible dans l'avenir d'extraire et de purifier les enzymes concernées, de les fixer sur des supports et de faire fonctionner des bioréacteurs enzymatiques.

IV. — Métabolisme de la morphine dans le genre *Papaver*

1. — *Sites de biosynthèse de la morphine*

Si les sites intracellulaires de biosynthèse sont encore mal connus, les sites d'accumulation des alcaloïdes sont assez bien inventoriés. D'une façon générale, ceux-ci ont tendance à s'accumuler dans les tissus en voie de croissance, dans les

gaines vasculaires et les vaisseaux laticifères. Chez *P. somniferum*, la morphine s'accumule dans le latex, particulièrement abondant dans les parois des capsules, mais tous les organes végétatifs en contiennent. La concentration en alcaloïdes décroît après la fécondation et les graines mûres n'en contiennent pas ou très peu.

Les alcaloïdes apparaissent très tôt au cours de la germination de *P. somniferum*. Des traces de morphine, thébaïne, papavérine et narcotine sont détectées dès le troisième jour de germination (Massicot, 1961) et la réticuline à partir du cinquième jour (Crane et Fairbairn, 1970). Les différences de composition entre capsules et plantules sont donc simplement d'ordre quantitatif, d'où l'hypothèse que l'influence du milieu pourrait être moins importante qu'on ne l'a cru sur la répartition des différents alcaloïdes.

Une étude approfondie du latex de *P. somniferum* a conduit à des résultats intéressants concernant les sites de biosynthèse, d'accumulation et de dégradation de la morphine. Le latex est capable de synthétiser de la morphine à partir de tyrosine marquée, aussi bien dans la plante après injection que dans du latex isolé (Fairbairn *et al.*, 1964a et 1964b). Une centrifugation du latex à 1 000 g pendant 30 min donne un culot d'organites vacuolaires comparables aux lutoïdes de l'Hévéa. Ce culot de vésicules contient 95 à 99 p. 100 des alcaloïdes du latex qui sont stockés dans le liquide vacuolaire des vésicules et non liés à leur partie membranaire. Ces vésicules isolés semblent par ailleurs comporter un équipement enzymatique important puisqu'ils synthétisent de la morphine à partir de la dopa (Fairbairn *et al.*, 1968c et 1970) et montrent une forte activité polyphénoloxydase dont deux fractions sont séparées; l'une partiellement liée aux membranes oxyde le catéchol, la dopa, le p. crésol; l'autre, soluble, oxyde en outre la tyrosine (Roberts, 1974). Les alcaloïdes pourraient donc être synthétisés à l'intérieur des vésicules des tiges et transportés par le mouvement ascendant du latex vers la capsule en rapide développement. Au cours de ce mouvement, la biosynthèse de la morphine peut continuer et celle-ci serait partiellement dégradée en dérivés qui, contrairement aux alcaloïdes, pourraient être transférés hors du latex de la capsule, en particulier dans les ovules.

2. — *Dégradation de la morphine*

La morphine a longtemps été considérée comme un cul-de-sac métabolique inerte qui s'accumule dans un organe de réserve et les variations notables observées dans la teneur en morphine des capsules suivant les conditions climatiques, le cycle diurne, l'amendement, n'ont pas encore pu être interprétés scientifiquement.

Certains travaux en cours mettent en évidence une biodégradation de la morphine dans la plante. Les résultats, décrits ci-après, sont encore trop imprécis quant à la structure des composés de dégradation obtenus pour pouvoir conforter les hypothèses émises sur la nature, le rôle et l'importance de cette biodégradation de la morphine chez *P. somniferum*.

Un rapide renouvellement des alcaloïdes de type morphinane du latex a été mis en évidence par incorporation de tyrosine marquée (Fairbairn *et al.*, 1964a et 1964b). Des variations considérables dans la répartition des alcaloïdes sont observées au cours d'une journée; la nuit, les taux de thébaïne et de codéine sont très élevés celui de morphine restant très faible. La morphine se dégraderait en permanence, même lorsque sa concentration totale augmente au cours du temps. Injectée dans la région du phloème du pédoncule floral, juste au-dessous des capsules, la morphine radioactive est rapidement absorbée dans le latex. Trois jours après, 90 p. 100 de la radioactivité a quitté la fraction alcaloïde et se retrouve dans

des substances polaires hors du latex, en particulier dans le péricarpe et les ovules (FAIRBAIRN et EL-MASRY, 1967); la nature de ces substances n'est pas exactement précisée. Certains de ces produits pourraient résulter de l'action d'enzymes localisées hors des laticifères et non spécifiques, mais induites ou activées à la suite de l'élévation anormale du taux de morphine dans le tissu végétal. La biosynthèse et le début de la dégradation de la morphine sont très importants dans le latex des tiges et des capsules et plus spécialement confinés dans les vésicules qui sédimentent à 1 000 g (FAIRBAIRN *et al.*, 1974).

Les graines produites sont également étudiées (FAIRBAIRN et EL-MASRY, 1968a). Il semble qu'une vigoureuse hydrolyse acide d'une part, la germination d'autre part, puissent libérer des substances de type alcaloïde, incluant la codéine, qui sont radioactives lorsque le latex des capsules a été alimenté en morphine marquée. Les auteurs en concluent que la morphine est sans doute rapidement métabolisée dans le latex en une série de composés dont certains sont de type alcaloïde et d'autres, insolubles dans l'éthanol, sont transférés hors du latex et accumulés dans les graines : il est donné à ces derniers le nom d'« alcaloïdes-liés ». Ces formes « liées » seraient dégradées au cours de la germination en substances plus petites de type alcaloïde. En fait, les teneurs en codéine et en morphine dans les graines sont très faibles. Une analyse fine de graines de *P. somniferum* par chromatographie en phase gazeuse (GROVE *et al.*, 1976) ne permet de détecter que des traces de codéine (0,1 à 0,5 ppm) et de morphine (0,5 à 1,7 ppm) libres. Après hydrolyse des « alcaloïdes-liés », 0,6 à 1,5 ppm de codéine et 0,6 à 4,2 ppm de morphine sont détectés. Le but des auteurs était de vérifier l'inocuité des graines de *P. somniferum* : en fonction de ces résultats, pour atteindre le seuil d'action physiologique, un individu devrait en consommer 3,5 kg.

D'autres travaux (MILLER *et al.*, 1973) ont nettement établi que la première étape de dégradation de la morphine est une N-déméthylation. En effet, la présence de normorphine (XI, tableau 2) a été établie pour la première fois d'un bout à l'autre du développement de *P. somniferum* placé dans une atmosphère contenant une teneur maintenue constante en $^{14}CO_2$. Les précurseurs marqués morphine et normorphine ont été en outre fournis avant la floraison et les résultats obtenus permettent les conclusions suivantes :

— La voie dégradative majeure de la morphine, si ce n'est la seule, implique une N-déméthylation irréversible puis une dégradation en métabolites non alcaloïdaux qui ne sont pas encore identifiés.

— Cette dégradation pourrait être plus intense dans le latex des tiges et ne pas s'effectuer dans les capsules car, dans les plantes sénescentes, la normorphine n'est pas détectée malgré une concentration élevée en morphine.

— Cette N-déméthylation qui termine la séquence de déméthylations commençant à la thébaïne permet d'envisager que ces alcaloïdes puissent jouer un rôle d'agents de méthylation dans le métabolisme de la plante. L'étude des méthyltransférases impliquées dans ces réactions permettrait de confirmer cette hypothèse. Le rôle d'agent de méthylation proposé pour les alcaloïdes n'est pas nouveau. Déjà la nicotine s'est révélée un bon donneur de méthyle et semble jouer un rôle dynamique dans le métabolisme de *Nicotiana alata*. La radioactivité de la nicotine injectée est en effet transférée à des acides aminés, des glucides et des pigments (TSO et JEFFREY, 1961). Les alcaloïdes n'étant pas détectés dans toutes les plantes, on ne peut attribuer à ces molécules un rôle aussi fondamental dans les transferts de méthyle que celui joué par la méthionine.

3. — *Formation d'alcaloïdes dans les cultures de tissus et de cellules*

Au cours de la dernière décennie, les techniques de culture de tissus végétaux, puis de cellules plus ou moins isolées, se sont rapidement développées. Avec les plantes à alcaloïdes, ces travaux ont maintenant comme objectif essentiel l'élaboration d'une technologie de culture cellulaire en « fermenteur », apte à produire de grandes quantités de molécules opiacées. C'est ainsi que les principaux Pavots producteurs de morphine ont été soumis, avec succès, à la culture de tissus : des plantules, des fragments de racines, de capsules, de tiges, voire de feuilles ont donné, selon les techniques maintenant classiques, des cals. Mais, à la grande surprise des chercheurs, la composition en alcaloïdes de ces tissus dédifférenciés diffère fortement de celle de leurs tissus d'origine, *in situ* dans la plante (BELLIARD, 1974; FURUYA *et al.*, 1972; IKUTA *et al.*, 1974). A partir de cette constatation, qui semble être valable également pour d'autres molécules que les alcaloïdes, des résultats divers doivent être discutés.

Dans une communication déjà ancienne, GRUTZMANN et SCHROTER (1966) rapportent l'absence d'alcaloïdes dans un tissu cultivé à partir de pédoncules floraux de *P. somniferum*. Cependant, ce tissu a conservé une forte activité enzymatique puisqu'il est capable de transformer et de dégrader de la thébaïne et de la codéine apportées au milieu de culture; à partir de la thébaïne, on décèle de petites quantités de codéine et de morphine dans le tissu ; celui-ci est assez peu spécifique de cette activité enzymatique puisque la même bioconversion est obtenue avec des cals provenant de pédoncules de *Nicotiana alata*. Ces résultats expérimentaux semblent montrer que, s'il y a un blocage de la biosynthèse des alcaloïdes apparentés à la morphine, il ne porte pas sur les étapes terminales mais au contraire sur la formation des précurseurs en amont de la thébaïne.

En réalité, les cultures de tissus ne sont pas dépourvues d'alcaloïdes. Des travaux japonais (FURUYA *et al.*, 1972; IKUTA *et al.*, 1974) ont démontré, au cours d'une étude systématique, que non seulement des cals dérivés de différents organes de *P. somniferum*, mais également ceux obtenus à partie de 11 espèces différentes de Papaveraceae :

— contiennent tous de la norsanguinarine, qui est normalement absente des plantes d'origine;

— contiennent des alcaloïdes du type benzophénanthridine, protopine ou aporphine (tabl. 1);

— sont dépourvus d'alcaloïdes du type morphinane.

De plus les bourgeons portés par ces cals, lorsqu'on les place sur un milieu qui permet la régénération de plantules, renferment également la norsanguinarine comme alcaloïde principal, que ces bourgeons proviennent de cals de *P. somniferum* ou de *P. bracteatum*. Par la suite les plantules retrouvent, au cours de leur développement, l'aptitude à synthétiser des alcaloïdes de type morphinane (IKUTA *et al.*, 1974).

D'autre part il a déjà été rapporté que dans les cultures de différents tissus prélevés sur *P. somniferum*, des analyses faites par chromatographie en couches minces ont permis de déceler une tache qui pourrait être de la sinoménine, sans qu'on détecte de morphine (BELLIARD, 1974). Il semble donc que la dédifférenciation des tissus s'accompagne non d'un blocage strict de la chaîne de biosynthèse des alcaloïdes de type morphinane, mais de déviations qui orientent le noyau phénylpropane de la tyrosine vers d'autres types de structure. Il serait intéressant de détecter ces points de déviation, qui pourraient bien être confondus en un seul

substrat, la réticuline. En effet, la (—)-réticuline conduit aux structures de type morphinane, alors que la (+)-réticuline est le précurseur des autres structures (benzophénanthridine, protopine), notamment de la sinoménine et de la sanguinarine (ROBINSON, 1968). Or ces alcaloïdes peuvent apparaître dans les cultures de tissus à la place de la thébaïne ou de la morphine et le présent travail a déjà souligné le rôle de plaque tournante de la (±)-réticuline dans le métabolisme de la morphine. La méthyltransférase qui produit la (—)-réticuline à partir de la norlaudanosoline ou l'enzyme qui utilise la réticuline pour former la (+)-salutaridine sont-elles les cibles de la modification qui intervient dans les cellules en culture par rapport aux cellules différenciées?

L'ensemble de ces résultats repose sur des analyses et des identifications d'alcaloïdes. Très souvent, la chromatographie en couche mince et la mesure des temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse sont les seuls critères d'identification des alcaloïdes extraits. Or le développement de la HPLC a mis en évidence l'insuffisance de ces techniques pour la plupart des corps, notamment pour la thébaïne et la morphine.

Que faut-il penser de l'observation récente (SCHAFFIEE *et al.*, 1976) de l'existence de thébaïne dans des cultures de tissus et de cellules obtenues à partir de graines de *P. bracteatum*? Si elle est analytiquement fondée, cette observation prouverait qu'un tissu dédifférencié peut conserver toutes ses potentialités de biosynthèse de la thébaïne. Dans ces conditions il n'y aurait, jusqu'à la thébaïne, ni blocage ni déviation de chaîne biosynthétique. Le problème reste donc entier et ne pourra recevoir quelque solution qu'après un approfondissement des travaux de chimie analytique et d'enzymologie dans ce domaine de la biochimie des alcaloïdes.

Conclusion

Au terme de cette analyse bibliographique des données dont on dispose actuellement sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la morphine, plusieurs questions demeurent sans réponse. En effet, si la chaîne de biosynthèse qui assure la transformation de molécules de tyrosine en morphine est connue dans ses grandes lignes, il n'est pas sûr que tous les intermédiaires possibles aient été identifiés. De même, les mécanismes réactionnels sont rarement décrits, le rôle des cofacteurs (coenzymes de réductases, ATP, etc.) reste hypothétique et les enzymes sont le plus souvent inconnues. En fait, l'enzymologie de cette biosynthèse reste à faire. Cet objectif suppose plus spécialement la mise en œuvre conjointement de la chromatographie à haute performance et de l'utilisation des substances intermédiaires marquées : c'est ainsi que la description de toutes les étapes de la biosynthèse pourra être obtenue. Parallèlement, un grand effort devra porter sur l'extraction et la purification des enzymes. Les aminotransférases qui interviennent au départ de la biosynthèse ont été repérées mais non purifiées. Les étapes médianes qui élaborent l'architecture du noyau morphinane doivent faire intervenir des cyclases et des isomérases : ces enzymes sont encore inconnues. Quant aux déméthylations des étapes terminales qui conduisent à la morphine, elles doivent faire intervenir des méthyltransférases dont les substrats et les cofacteurs restent à définir. Il y aurait cependant de nombreuses raisons d'isoler et d'étudier ces enzymes.

En premier lieu, l'inventaire des enzymes impliquées et la description de

leur localisation permettrait de mieux aborder la sélection des Pavots, entre les Pavots à thébaïne, les Pavots à morphine et l'éventuel Pavot à codéine. Un second groupe de raisons tient à l'utilisation industrielle qui pourrait être faite de ces enzymes pour transformer la thébaïne en codéine et la codéine en morphine et inversement. Connaître leur spécificité, leur loi d'action et pouvoir les préparer dans un état purifié permettraient d'envisager leur fixation sur support et la mise en œuvre d'une technologie de réacteurs enzymatiques copiant les étapes ultimes de la chaîne biosynthétique de la morphine. Enfin, sur un plan physiologique, il serait intéressant d'élucider le mode d'action analgésique de la codéine dans le système nerveux; l'une des explications suppose qu'une faible proportion de codéine serait transformée en morphine qui constituerait alors l'effecteur réel *in situ*; certains tissus animaux seraient donc également pourvus de déméthylases aptes à transformer ces alcaloïdes comme dans les tissus végétaux (Axelrod, 1955). A différents titres, l'étude des enzymes qui catalysent les étapes de transformation thébaïne → codéine → morphine présente un intérêt fondamental. Ce thème mériterait des recherches pluridisciplinaires beaucoup plus développées que celles qui ont été faites jusqu'à maintenant.

Reçu pour publication en mai 1978.

Summary

Mechanism and enzymes in morphine biosynthesis : a review

The knowledge of alkaloid biosynthesis strongly progressed during the two last decades when labelled precursors were extensively used. Among all the metabolic pathways, morphine biosynthesis in *Papaver somniferum* is one of the best known. After a rapid review on the question, this paper presents the pathways which were recently investigated on the last steps and sites of morphine biosynthesis, and the eventual role played by these alkaloids in plants. The role of (±)-reticuline in the diversification of alkaloid metabolic pathways into *Papaver*, the systematic research of the enzymes involved, the role of latex in biosynthesis and degradation of the morphine, the alkaloid production by poppy tissue cultures are the main problems discussed in this review.

Références bibliographiques

Antoun M. D., Roberts M. F., 1975*a*. Some enzymes of general metabolism in the latex of *P. somniferum*. *Phytochem.*, **14**, 909-914.

Antoun M. D., Roberts M. F., 1975*b*, Phosphatases in the latex of *Papaver somniferum*. *Phytochem.*, **14**, 1275-1278.

Antoun M. D., Roberts M. F., 1975*c*. Enzymic studies with *Papaver somniferum*. 5. The occurence of methyltransferase enzymes in poppy latex. *Planta Medica*, **28**, 6-11.

Asghar S. S., Siddiqi M., 1970. Phenolase of *P. somniferum*. I. Isolation of the enzyme and its substrate specificity. *Enzymologia*, **39**, 289-306.

Axelrod J., 1955. The enzymatic conversion of codeine to morphine. *Pharm. Exp. Ther.*, **115**, 259-267.

Barton D. H. R., Kirby G. W., Steglich W., Thomas G. M., Battersby A. R., Dobson T. A., Ramuz H., 1965. Investigations on the biosynthesis of morphine alkaloids. *J. Chem. Soc.*, 2423-2428.

Barton D. H. R., Bhakuni D. S., James R., Kirby G. W., 1967. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XII. Stereochemical studies related to the biosynthesis of the morphine alkaloids. *J. Chem. Soc.* (C), 128-132.

BATTERSBY A. R., BINKS R., 1960. Biosynthesis of morphine : Formation of morphine from norlaudanosoline. *Proc. Chem. Soc.*, 360-361.

BATTERSBY A. R., BINKS R., FRANCIS R. J., Mc CALDIN D. J., RAMUZ H., 1964. Alkaloid bio. synthesis. Part IV. 1-benzylisoquinolines as precursor of thebaine, codeine and morphine. *J. Chem. Soc.*, 3600-3610.

BATTERSBY A. R., FOULKES D. M., BINKS R., 1965. Alkaloid biosynthesis. Part. VIII. Use of optically active precursors for investigations on the biosynthesis of morphine alkaloids *J. Chem. Soc.*, 3323-3332.

BATTERSBY A. R., MARTIN J. A., 1967. Alkaloid biosynthesis. Part X. Terminal steps in the biosynthesis of the morphine alkaloids. *J. Chem. Soc.* (C), 1785-1788.

BATTERSBY A. R., FOULKES D. M., HIRST M., PARRY G. V., STAUNTON S., 1968. Alkaloid biosynthesis. Part XI. Studies related to the formation and oxidation of reticuline in morphine biosynthesis. *J. Chem. Soc.* (C), 210-216.

BATTERSBY A. R., JONES R. C. F., KAZLAUSKAS R., 1975. Experiments on the early steps of morphine biosynthesis. *Tetrahedron Letters*, 1873-1876.

BELLIARD G., 1974. Recherche d'alcaloïdes dans les cals de pavot cultivés *in vitro* (*Papaver somniferum :* œillette et *Papaver orientale*). Thèse de 3e cycle, 76 p., Université Paris-Sud Orsay.

BLASCHKE G., PARKER H. I., RAPOPORT H., 1967. Codeinone as the intermediate in the biosynthetic conversion of thebaine to codeine. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 1540-1541.

BOHM H., 1966. Biochemisch-genetische Probleme der Züchtung eines Arzneimohns. *Herba Hung.*, **5**, 123-126.

BROCHMANN-HANSSEN E., 1971. Aspects of chemistry and biosynthesis of opium alkaloids, in 1st international congress of pharmacognosy and phytochemistry. Ed. WAGNER H. et HÖRHAMMER L., 347-369. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

CRANE F. A., FAIRBAIRN J. W., 1970. Alkaloids in the germinating seedling of poppy. *Trans. Illinois St. Acad. Sci.*, **63**, 86-92.

FAIRBAIRN J. W., PATERSON A., WASSEL G., 1964*a*. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. II. ^{14}C isotopic studies of the rapid changes in the major alkaloids. *Phytochem.*, **3**, 577-582.

FAIRBAIRN J. W., WASSEL G., 1964*b*. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. — III. Biosynthesis in the isolated latex. *Phytochem.*, **3**, 583-585.

FAIRBAIRN J. W., EL-MASRY S., 1967. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. — V. Fate of the « end-product » alkaloid morphine. *Phytochem.*, **6**, 499-504.

FAIRBAIRN J. W., EL-MASRY S., 1968*a*. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. — VI. « Bound » morphine and seed development. *Phytochem.*, **7**, 181-187.

FAIRBAIRN J. W., DJOTE M., PATERSON A., 1968*b*. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. VII. Biosynthetic activity of the isolated latex. *Phytochem.*, **7**, 2111-2116.

FAIRBAIRN J. W., PALMER J. M., PATERSON A., 1968*c*. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. — VIII. Organelle activity of the isolated latex. *Phytochem.*, **7**, 2117-2121.

FAIRBAIRN J. W., DJOTE M., 1970. Alkaloid biosynthesis and metabolism in an organelle fraction in *Papaver somniferum*. *Phytochem.*, **9**, 739-742.

FAIRBAIRN J. W., HAKIM F., EL KHEIR Y., 1974. Alkaloidal storage, metabolism and translocation in the vesicles of *Papaver somniferum* latex. *Phytochem.*, **13**, 1133-1139.

FURUYA T., IKUTA A., SYÔNO K., 1972. Alkaloids from callus tissues of *Papaver somniferum*. *Phytochem.*, **11**, 3041-3044.

GROVE M. D., SPENCER G. F., WAKEMAN M. V., TOOKEY H. L., 1976. Morphine and codeine in poppy seed. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 896-897.

GRUTZMANN K. D., SCHROTER H. B., 1966. Zur Umwandlung von Thebain in Gewebekulturen, in Internationale Symposium Biochemie und Physiologie der Alkaloide. *Abhandl. Deut. Akad., Kl. Chem. Geol. Biol.*, n° **3**, 347.

HODGES C. C., HORN J. S., RAPOPORT H., 1977. Morphinan alkaloids in *Papaver bracteatum*: biosynthesis and fate. *Phytochem.*, **16**, 1939-1942.

IKUTA A., SYÔNO K., FURUYA T., 1974. Alkaloids of callus tissues and redifferentiated plantlets in the papaveraceae. *Phytochem.*, **13**, 2175-2176.

JINDRA A., KOVACS P., PITTNEROVA Z., PSENAK M., 1966. Biochemical aspects of the biosynthesis of opium alkaloids. *Phytochem.*, **5**, 1303-1315.

KIRBY G. W., MASSEY S. R., STEINREICH P., 1972. Biosynthesis of unnatural morphine derivatives in *Papaver somniferum*. *J. C. S. Perkin I*, 1642-1647.

KOVACS P., 1970. Zur Trennung der Transaminase des L-Phenylalanins, L-Aspartats und L-Ornithins aus Keimlingen des Schalmohns (*Papaver somniferum* L.). *Biologia* (Bratislava), **25**, 359-364.

KOVACS P., 1975. Dipeptidase activity in *Papaver somniferum* L., cv., « Dubsky » seedlings. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **169**, 273-279.

KOVACS P., BESENOVA M., 1976. Some properties of aminopeptidases from seedlings of *Papaver somniferum* L., cv. « Dubsky ». *Biologia* (Bratislava), **31**, 423-430.

KUHN L., PFEIFER S., 1963. Die Gattung *Papaver* und ihre Alkaloide. *Pharmazie*, **18**, 819-843.

KUPPERS F. J., SALEMINK C. A., BASTART M., PARIS M., 1976. Alkaloids of *Papaver bracteatum* : Presence of codeine, neopine and alpinine. *Phytochem.*, **15**, 444-445.

LEETE E., 1969. Alkaloid biosynthesis, in Advances in enzymology, ed. NORD F. F., Vol. 32, 373-422. Interscience Publishers, New York, London, Sydney, Toronto.

MASSICOT J., 1961. Biosynthèse des alcaloïdes dans les plantules de pavot. *Ann. Pharm. Franç.*, **19**, 44-52.

MILLER R. J., JOLLES C., RAPOPORT H., 1973. Morphine metabolism and normorphine in *Papaver somniferum*. *Phytochem.*, **12**, 597-602.

MOTHES K., SCHUTTE H. R., 1963. Biosynthesis of alkaloids II. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **2**, 441-458.

PARKER H. I., BLASCHKE G., RAPOPORT H., 1972. Biosynthetic conversion of thebaine to morphine. *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 1276-1282.

PING CHUANG CHENG, 1972. Cultivation and analysis of *Papaver bracteatum* L. Thesis Master Sci. Pharm., 60 p., University of Mississippi.

RAPOPORT H., STERMITZ F. R., BAKER D. R., 1960. The biosynthesis of opium alkaloids. I. The interrelationship among morphine, codeine and thebaine. *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 2765-2772.

RAPOPORT H., 1966. Internationale Symposium Biochemie und Physiologie der Alkaloide. *Abhandl. Deut. Akad., Kl. Chem. Geol. Biol.*, n° **3**, 313.

ROBERTS M. F., 1971. Polyphenolases in the 1 000 g fraction of *Papaver somniferum* latex. *Phytochem.*, **10**, 3021-3027.

ROBERTS M. F., 1974. Oxidation of tyrosine by *Papaver somniferum* latex. *Phytochem.*, **13**, 119-123.

ROBINSON T., 1968. Isoquinoline, aporphine and morphinan alkaloids, in The biochemistry of alkaloids, 54-71. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.

SANTAVY F., 1970. Papaveraceae alkaloids, in The alkaloids, ed. MANSKE R. H. F., Vol. XII, 361-364. Academic Press, New-York.

SHAFFIEE A., LALEZARI I., YASSA N., 1976. Thebaine in tissue culture of *Papaver bracteatum* L., population Arya II. *Lloydia*, **39**, 380-381.

SPENCER I. D., 1968. Alkaloids related to norlaudanosoline, in Comprehensive Biochemistry, ed. FLORKIN M. and STOTZ E. H., Vol. 20, 309-323. Elvesier, Amsterdam.

THEUNS H. G., VAN DAM J. E., LUTEIJN J. M., SALEMINK C. A., 1977. Alkaloids of *Papaver bracteatum* : 14-β-hydroxycodeinone, 14-β-hydroxycodeine and N-methyl-corydaldine. *Phytochem.*, **16**, 753-755.

TSO J. C., JEFFREY R. N., 1961. Biochemical studies on tabacco alkaloids. IV. The dynamic states of nicotine supplied to *N. rustica*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 253-256.

WILSON M. L., COSCIA C. J., 1975. Studies on the early stage of *Papaver* alkaloid biogenesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 431-432.

WU F. F., DOBBERSTEIN R. H., 1977. Quantitative determination of thebaine in *Papaver bractatum* by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chrom.*, **140**, 65-70.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (3), 739.

Chronique des livres

J. Ribéreau-Gayon, E. Peynaud, P. Ribéreau-Gayon, P. Sudraud. — Sciences et techniques du vin. Traité d'Œnologie. Dunod, 155 × 240, cartonné.

Tome 1 : Analyse et contrôle des vins. 1975. 688 pages. Nouveau tirage 1978 (*ISBN 2-04-007382*) . . . . . 290 FF

Tome 2 : Caractères des vins. Maturation du raisin. Levures et bactéries. Nouveau tirage 1977. 576 pages, 124 tableaux, 127 figures, bibliographies (*ISBN 2-04-001324-5*) . . . . . 250 FF

Tome 3 : Vinifications. Transformations du vin. Nouveau tirage 1977. 738 pages, 107 figures, bibliographies (*ISBN 2-04-004638-0*). . . . . 340 FF

Tome 4 : Clarification et stabilisation. Matériels et installations. 1977. 668 pages, 119 tableaux, 127 figures, 7 photos (*ISBN 2-04-005182-1*) . . . . . 340 FF

L'art d'obtenir le meilleur vin possible à un prix de revient minimum est désormais devenu une science faisant appel aux acquisitions de la recherche et, par conséquent, à des spécialistes qualifiés.

C'est aux différents aspects de cette science, appelée « œnologie », qu'est consacré l'important traité « Sciences et techniques du vin » qui, dans son ensemble, comporte quatre volumes.

Le premier volume de « Sciences et techniques du vin » traité d'analyse et de contrôle : il faut entendre par là le contrôle de la conformité aux règlements et le contrôle des opérations techniques.

Le second tome se décompose en trois grandes parties : types et caractères des vins : notions de qualité, de grandes catégories de vins et de vignobles, d'hybrides, de coupage, de dégustation; le raisin et sa maturation; les agents de la vinification, c'est-à-dire les levures et les bactéries qui font le vin, le transforment, sont pour une part responsables de son goût et peuvent même le détruire.

Le troisième volume est consacré plus directement aux méthodes de vinification et aux transformations du vin. Il traite donc d'opération très importantes conduisant à transformer en vin le raisin et son jus.

Le quatrième et dernier volume présente les processus de clarification et de stabilisation et aborde un domaine en plein développement, celui des matériels et installations. Pour ces derniers, il a été fait plus particulièrement appel à des spécialistes des équipements viti-vinicoles et des techniques de l'embouteillage et du bouchage. Comme dans l'ensemble du traité, les auteurs décrivent non seulement des modes opératoires et des traitements, mais recherchent également les conditions favorables à la sauvegarde et à l'amélioration de toutes les qualités du produit.

Analyse de l'Éditeur.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1978

Vol. 27 - N° 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 739-765.

Étude bactériologique et biochimique du procédé de stérilisation par friction A.T.A.D. appliqué aux produits laitiers

C. ALAIS, G. HUMBERT, S. E. CHUON
Laboratoire de Biochimie Appliquée
Université de Nancy I, 54037 Nancy

Résumé

Diverses caractéristiques du traitement des produits laitiers par le procédé de stérilisation ultra-rapide par friction ont été étudiées, en employant des techniques adaptées au double but : 1. L'appareillage A.T.A.D. se comporte-t-il effectivement comme un stérilisateur ? 2. Quelles sont les modifications physico-chimiques et biochimiques qui interviennent dans les conditions de la pratique ?

L'appareil pilote UF-300 a fonctionné deux ans sans problèmes mécaniques. La stérilité, déterminée par la stabilité du lait à 30 °C, a été régulièrement atteinte à la température de 140 °C à la sortie de la turbine, avec un temps de séjour de 0,54 s. Cependant, l'efficacité stérilisante, calculée sur la base des sporulés mésophiles est comprise en général entre 4, et 5,6; elle augmente peu avec l'élévation de la température. L'homogénéité du traitement thermique paraît grande.

Ce procédé n'altère pas les qualités organoleptiques; des améliorations de goût ont été constatées. Les propriétés physicochimiques sont peu touchées. Un effet d'homogénéisation a été mis en évidence. La crème ne subit pas de destabilisation; le lait sucré additionné d'amidon n'est pas modifié.

La répartition des formes de l'azote est moins perturbée à 140 °C que par la stérilisation U.H.T. à 140 °C/2 s. La composition en acides aminés, l'étude électrophorétique, la digestion enzymatique et la disponibilité de la lysine confirment le caractère bénin de ce traitement dans ses effets secondaires. L'aptitude à la coagulation par la présure est facilement rétablie par addition de chlorure de calcium; le lait stérilisé à 140 °C peut être converti en fromage.

Au niveau des enzymes du lait, 3 cas se présentent (traitement de 130 à 150 °C) :

— inactivation complète irréversible; lactoperoxydase, lipase;

— modifications moléculaires limitées : inactivation puis réactivation de la phosphatase alcaline; persistance d'une activité protéasique notable;

— activation de la ribonucléase.

La technique A.T.A.D. mérite d'être développée, avec accroissement du débit (augmentation du diamètre et de la vitesse). Selon le coût de l'énergie électrique, elle peut être appliquée à des produits alimentaires courants ou réservées à des produits ayant une certaine valeur marchande.

MOTS CLÉS : *produits laitiers, stérilisation par friction, procédé A.T.A.D., bactériologie, constituants azotés, enzymes.*

I. — Introduction

1.1. — *Évolution du procédé A.T.A.D.*

La Société française A.T.A.D. (1967) a déposé successivement deux brevets, suivis d'un certificat d'addition (1971) concernant le procédé de stérilisation par friction, sans apport de chaleur, inventé par ANGUE et WANDER (1967).

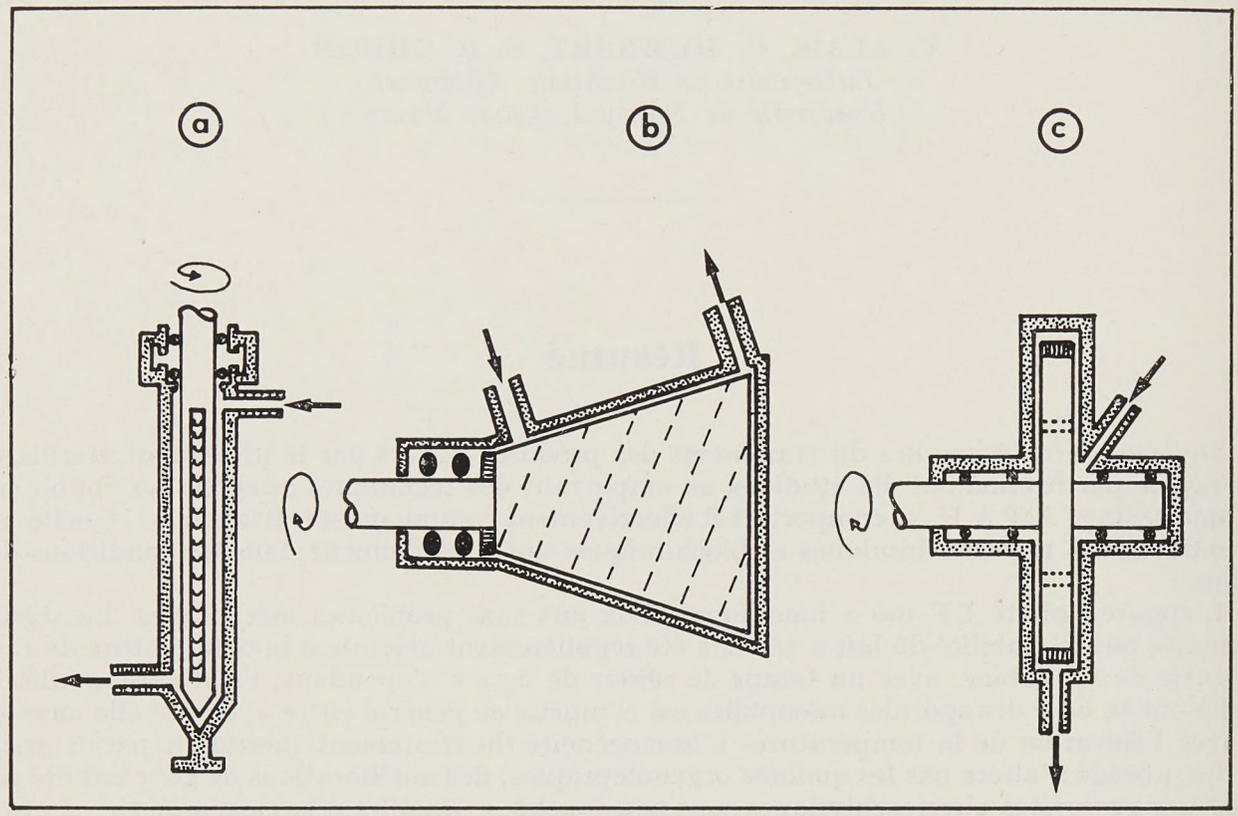


FIG. 1. — *Évolution du bloc stérilisateur A.T.A.D.*
a) Tube chauffant, *b*) cône strié, *c*) disque ajouré

La SEFFAC (Société d'Équipement de Fromagerie pour la Fabrication en Continu) fut chargée des travaux de mise au point, de la fabrication et de la commercialisation. Cette société est aujourd'hui inactive. Quelques appareils fonctionnent ou ont fonctionné en France et en Autriche pour le traitement de produits laitiers et de produits diététiques variés.

Le système initial a beaucoup évolué, comme le montre la figure 1. Les appareils élaborés par SEFFAC comportent un disque, dont le diamètre en mm caractérise le modèle : UF 400, UF 300 (UF pour « Ultra flash »).

1.2. — *Principe*

Le procédé de stérilisation par friction A.T.A.D. met en œuvre un phénomène physique connu : dans un écoulement à viscosité prépondérante, le fluide compris entre deux surfaces très rapprochées en mouvement relatif rapide subit une augmentation également rapide de la pression et un échauffement important.

Le stérilisateur A.T.A.D. actuel se compose d'un disque en acier inoxydable (acier au nickel, chrome, molybdène, cuivre) de 300 ou 400 mm de diamètre, tournant à grande vitesse (4 000 à 5 000 tours par mn) entre deux flasques fixes de même alliage. L'écart très réduit entre le rotor et le stator est de l'ordre de 0,3 mm. Le liquide à stériliser est préchauffé; il entre au voisinage du moyeu et sort à la périphérie en subissant un échauffement interne par friction extrêmement rapide, inférieur à 1 seconde. Une sonde thermique située à la sortie du disque enregistre la température de stérilisation et commande une électrovanne régulant le débit au niveau du bloc stérilisateur. La figure 2 schématise l'appareil.

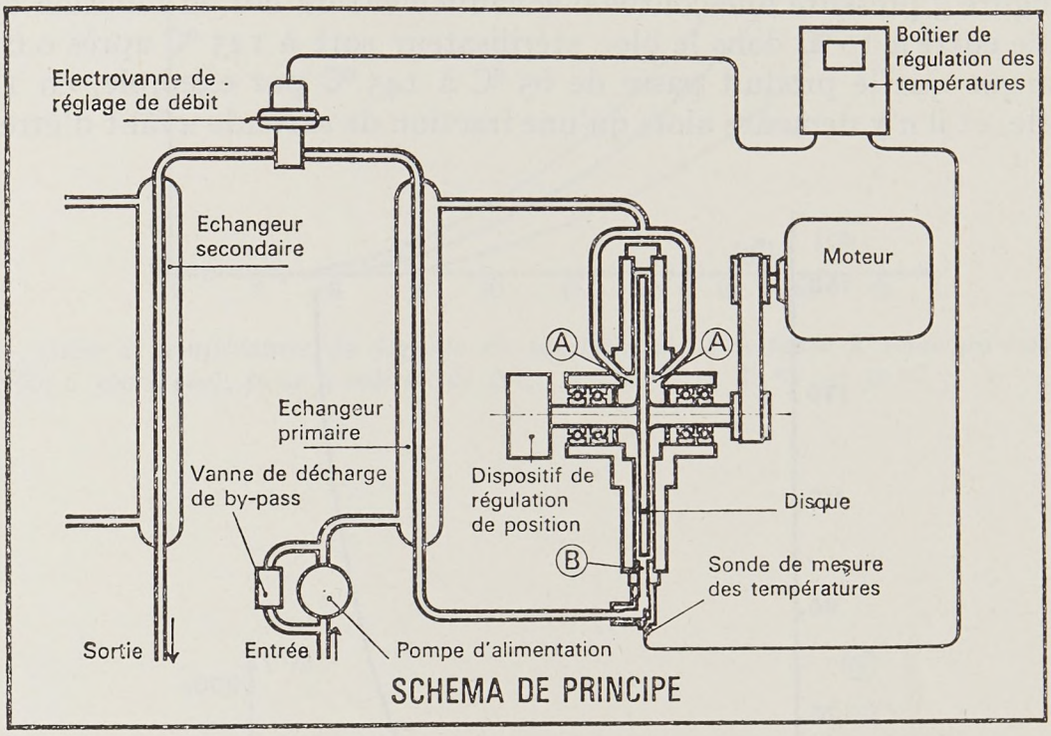


FIG. 2. — *Le système A.T.A D. actuel.*
(A) entrée du lait cru, (B) sortie du lait stérilisé.

En fait, dans ce stérilisateur, la presque totalité de la puissance (P) fournie par le moteur (50 à 150 cv) entraînant le disque est dégradée en chaleur et sert à élever la température du fluide. Le débit (Q) de la machine est uniquement fonction de la puissance du moteur d'entraînement et de l'échauffement du fluide à stériliser (ΔT).

$$Q = K\frac{P}{\Delta T}$$

De nombreux essais ont permis de déterminer, pour chaque produit, en fonction de la vitesse de rotation, d'une part, et du diamètre du disque, d'autre part, la puissance absorbée en relation avec la valeur du ΔT appliqué. Il est ainsi possible de connaître la puissance à mettre en jeu pour stériliser un produit donné à un débit voulu.

La pression au niveau du disque passe de 4 à 14 kg /cm², sous l'action de la force centrifuge. Dans le cas du lait, la température de sortie est d'environ 140-160 °C; la force centrifuge crée à la périphérie du disque une pression suffisante pour empêcher le liquide de bouillir à l'intérieur de l'appareil. La rotation du disque provoque donc simultanément, d'une part, la génération d'une quantité de chaleur néces-

saire à la stérilisation et d'autre part la génération d'une pression permettant d'effectuer le traitement en phase liquide. En outre, cette pression élevée et l'effet mécanique de la friction provoquent une homogénéisation de la matière grasse, dans le cas de stérilisation de lait ou crème.

1.3. — *Problèmes thermiques*

Des mesures précises ont été effectuées soit dans les installations propres de la SEFFAC, soit au Centre de Recherche des fromageries HUTIN.

La figure 3 présente une courbe d'échauffement du lait en fonction du temps. Un liquide entré à 10 °C dans le bloc stérilisateur sort à 145 °C après 0,6 seconde. On remarque que le produit passe de 65 °C à 145 °C par exemple, en 1 dixième de seconde, et il n'y demeure alors qu'une fraction de seconde avant d'être refroidi.

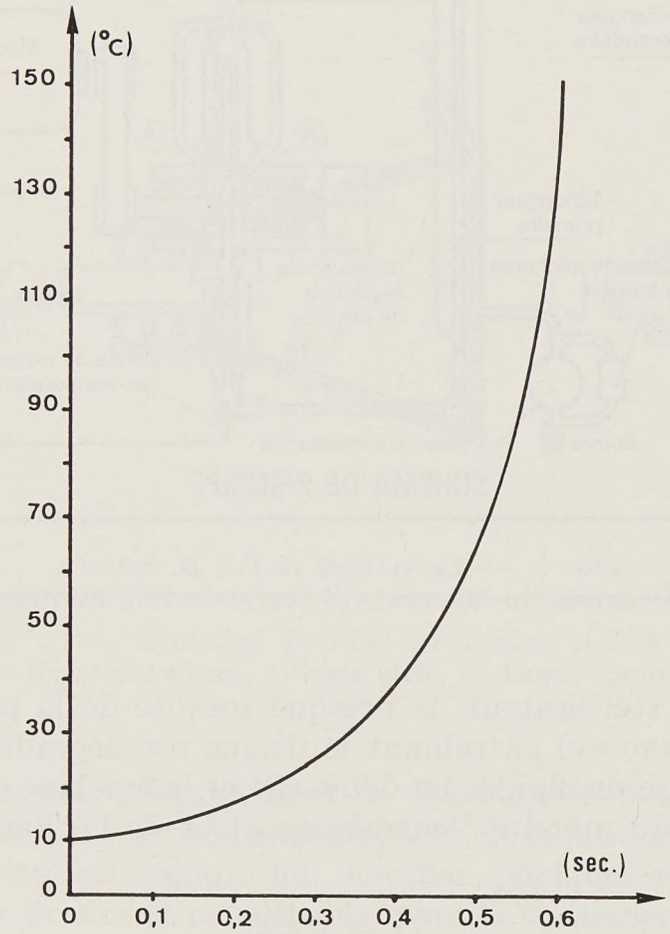


FIG. 3. — *Montée en température en fonction du temps de séjour dans le stérilisateur.*

La répartition radiale des températures dans l'entrefer a été réalisée en disposant le long d'un rayon, à différentes distances radiales de l'axe, des thermocouples qui peuvent mesurer les variations de températures. Ces mesures ont été faites sur un appareil UF 300 pour une vitesse de rotation de 6 500 t/min. et pour des ΔT de 50, 80 et 110 °C. Elles montrent que la température de stérilisation n'est atteinte que dans une faible couronne périphérique (fig. 4). Pour obtenir une élévation de température donnée, c'est-à-dire un ΔT donné, il existe donc une certaine vitesse périphérique minimum. De plus, la variation de température le

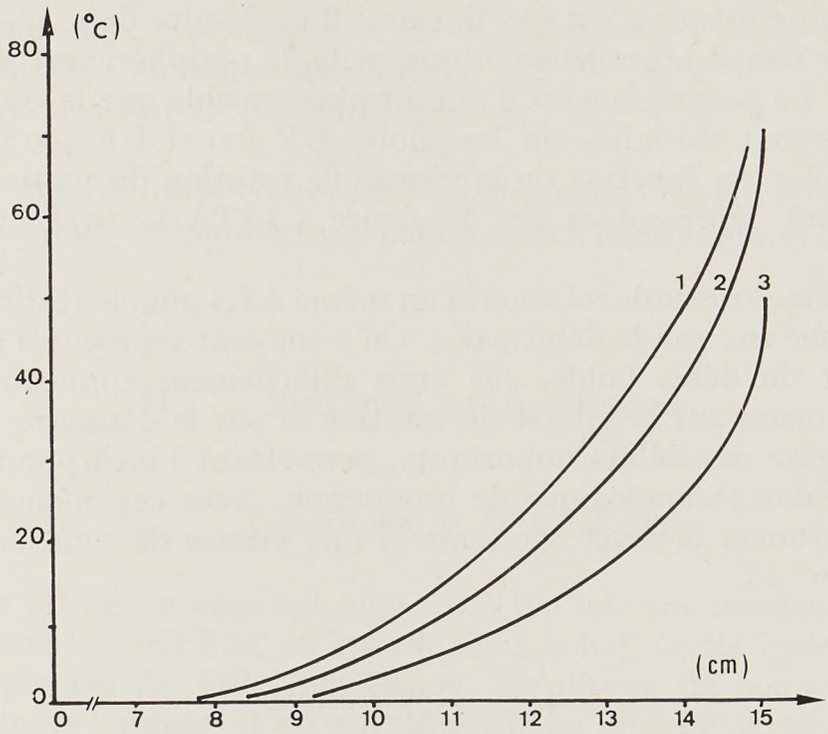


FIG. 4. — *Gain de température du liquide en fonction de la distance à l'axe du rotor (appareil UF-300, 6 500 t/mn), pour 3 valeurs de ΔT : 1) 110 °C, 2) 80 °C, 3) 50 °C.*

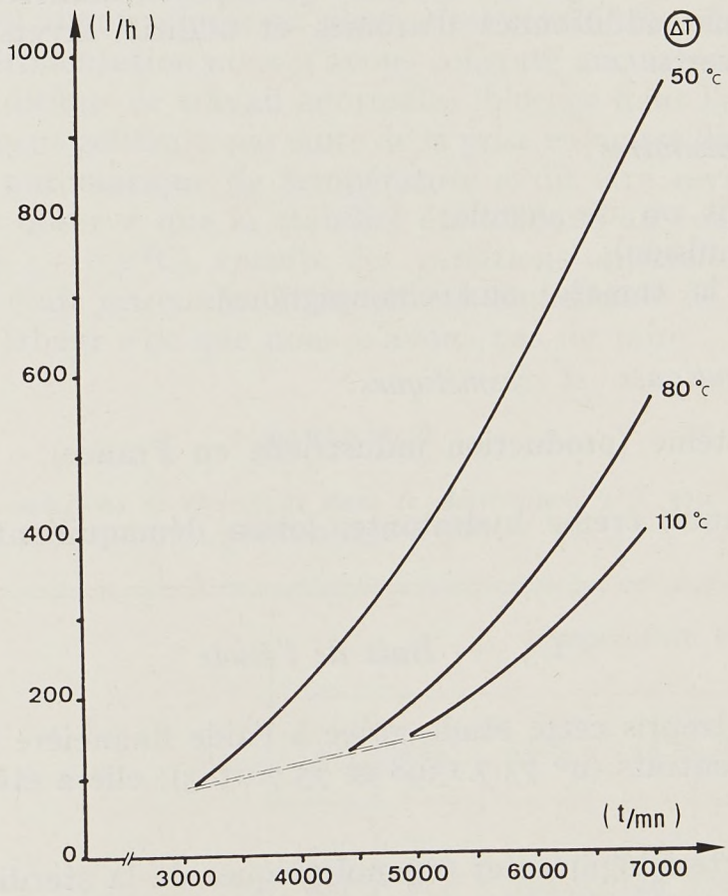


FIG. 5. — *Débit du lait en fonction de la vitesse du rotor (appareil UF-300).*

long d'un rayon du disque n'est pas linéaire; il en résulte donc que la partie centrale reste à une température basse et que seule, la périphérie est portée à la température élevée. Le phénomène est d'autant plus sensible que le ΔT est plus élevé.

Des mesures ont été faites sur les pilotes UF 300 et UF 400 pour tracer des courbes où le débit est fonction de la vitesse de rotation du moteur pour des ΔT donnés; elles sont représentées sur la figure 5 (ATAD, 1971), pour le modèle UF-300.

Pour une même vitesse de rotation et un même ΔT, l'augmentation de 100 mm du diamètre multiplie environ le débit par 4. On a souvent reproché à cette invention que, par le fait du débit faible, elle était difficilement applicable à l'industrie laitière; or, en jouant sur la vitesse de rotation et sur le diamètre du rotor, il est possible d'atteindre des débits importants, permettant l'incorporation de l'appareil dans une chaîne technologique de production. Avec ces mêmes courbes il est possible de déterminer le débit nécessaire à une vitesse de rotation donnée, pour avoir un certain ΔT.

1.4. — *Applications*

Cet appareil de stérilisation par friction permet de traiter une grande variété de liquides, alimentaires ou autres, même visqueux. Des essais ont été faits, à notre connaissance, sur les produits suivants :

Produits laitiers :

— lait entier, ou écrémé ou concentré;
— crème pasteurisée légère et normale (production industrielle en Autriche);
— lait et crème additionnés d'arômes et additifs divers : crèmes glacées, crèmes-desserts.

Autres produits alimentaires :

— jus de fruit ou de viande;
— sauces (émulsion);
— soupes (à la tomate, aux champignons).

Produits pharmaceutiques et cosmétiques :

— lait de protéine (production industrielle en France);
— collyre;
— lait de beauté, crème hydratante, lotion démaquillante.

1.5. — *Buts de l'étude*

Nous avons entrepris cette étude grâce à l'aide financière de la D.G.R.S.T. répartie sur deux contrats (n° 73.7.1398 et 75.7.0383); elle a été réalisée selon le plan suivant :

— Aspects bactériologiques et organoleptiques de la stérilisation du lait.
— Propriétés physicochimiques.
— Aptitude à la coagulation par les enzymes.

— Effets sur les protéines.
— Effets sur les enzymes du lait.
— Stérilisation d'autres produits.

Une partie des résultats concernant les protéines, les enzymes et l'aptitude à la coagulation a déjà été publiée; ces points seront donc résumés dans cette communication.

II. — Matériel et méthodes

2.1. — *Conditions de la stérilisation*

Nous avons utilisé un appareil pilote UF-300 mis gracieusement à notre disposition par la Société SEFFAC et installé dans le hall de technologie de l'I.U.T. de Biologie Appliquée de Villers-les-Nancy. Le disque de 300 mm de diamètre tourne à 4 500 tours/minute; il est entraîné par un moteur de 50 chevaux ayant une vitesse de rotation de 3 000 t/min. Le stérilisateur est équipé de deux sections d'échangeur de température tubulaire. Le volume de l'échangeur est de 2,7 l, plus 0,14 l pour le tuyau de raccordement à la turbine, ce qui a permis de calculer la durée de préchauffage à la température choisie (60, 65, 70 °C) en tenant compte de l'efficacité de l'échangeur indiquée par le constructeur. Une hotte de prélèvement aseptique (boîte à gants modifiée) a été installée à la sortie de l'échangeur de refroidissement; elle était stérilisée, avant les opérations, par des tubes U.V.

Le dispositif de positionnement et d'équilibrage du disque, installé par SEFFAC sur cet appareil avant sa mise en place, s'est révélé très efficace; au cours de deux années d'expérimentation nous n'avons constaté aucun signe de frottement, même dans des conditions de travail anormales (blocage dans l'appareil d'un produit additionné d'agent gélifiant, par suite de la prise en masse dans le réfrigérant).

La régulation automatique de température a dû être revue après quelque temps. Nous avons observé que la stabilité était bonne au cours du passage de 60-80 litres de laits (± 0,7 °C), ensuite des variations apparaissaient. Après nettoyage, la stabilité était retrouvée. Il aurait été souhaitable de passer le produit à traiter au « débourbeur » ce que nous n'avons pas pu faire.

TABLEAU I

Conditions de chauffage dans le stérilisateur UF 300
(préchauffage à 70°)

	Température (°C)						
	130°	135°	140°	145°	150°	155°	160°
Durée (s)	0,27	0,41	0,54	0,68	0,82	0,96	1,10
Débit (l/h)	320	214	164	129	108	92	81
Durée du préchauffage (s)	3,0	4,2	5,5	7,0	8,2	9,8	10,5

Nous avons mesuré les paramètres de stérilisation du lait pour un préchauffage de 70 °C; la température est enregistrée par la sonde thermique placée à la sortie du disque; elle commande la plus ou moins grande ouverture de l'électrovanne de régulation de débit. Le débit dépend donc de la température choisie; plus la température de stérilisation sera élevée, plus le débit sera faible et plus la durée de stérilisation sera longue (tabl. 1).

2.2. — *Plan de l'expérimentation*

En dehors des essais préliminaires pour les réglages et de ceux qui n'ont pas été pris en compte à cause de l'instabilité de la température, 41 expériences de stérilisation de différents produits à différentes températures ont été effectuées, ayant donné lieu à des analyses, selon le plan ci-après :

	130 °C	135 °C	140 °C	150 °C	160 °C
Lait normal	5	1	7	7	3
Lait chargé de spores	1	1	1	1	
Lait + agents gélifiants			2	2	
Crème (à 12 et à 33 p. 100)			5	4	
Caséinate			1		
	6	2	16	14	3

Il s'agit de laits de grand mélange prélevés à la réception d'une usine. A titre de comparaison, 20 de ces laits ont été stérilisés à l'autoclave à 120 °C durant 15 min. En outre, on a prélevé 15 fois le lait stérilisé U.H.T. classique en brique, au moment du traitement du lait cru correspondant, mais on ne peut pas assurer qu'il s'agit exactement du même lait, ce qui fait que la comparaison est sujette à réserve. Le traitement U.H.T. était effectué par chauffage indirect à 140 °C dans un appareil STORCK, le temps indiqué par le constructeur étant de 1 à 2 secondes à cette température.

2.3. — *Méthodes bactériologiques*

Une analyse assez complète a été effectuée à la fois sur le produit cru et sur le produit stérilisé dans 23 essais (19 laits et 4 crèmes). Les autres essais n'ont comporté que le contrôle de la stérilité. Les examens suivants ont été pratiqués :

— dénombrement des bactéries mésophiles (30 °C) et thermophiles (55 °C), sur plaques de « tryptone-agar F.I.L. », après 1, 2 et 3 jours. Dans le cas des produits stérilisés, étant donné le très petit nombre de germes, le dénombrement a été fait avec 20 fois 1 ml prélevé dans plusieurs flacons de 250 ml remplis à divers moments du passage dans le stérilisateur;

— recherche des bactéries anaérobies sporulées (épreuve de PAQUET-GAUVIN);

— dénombrement des bactéries sporulées du produit cru, après chauffage à 80 °C/10 min. sur gélose à l'extrait de levures et à l'amidon;

— épreuves de conservation : 1) 20 °C/30 j; 2) 30 °C/20 j; 3) 55 °C/10 j, avec à la fin mesure du pH et dénombrement des survivants sur milieu à l'amidon.

Les méthodes d'analyse et les milieux de culture utilisés sont décrits dans le tome 2 de l'ouvrage de fiches rédigé par la Direction des Services Vétérinaires : « Contrôle de la qualité des produits laitiers ».

Pour contrôler l'efficacité stérilisatrice de cet appareil, la collection de sporulés du laboratoire (types *subtilis*, *cereus*, et *calidolactis*) ne comprenait aucune souche résistant à 130 °C (chauffage de 30 s environ dans un tube de verre mince). On a alors utilisé un flacon altéré à 30 °C d'un lait stérilisé à 130 °C et dont le contenu était apparemment une culture pure de *Bacillus cereus*. Cette souche a été repiquée sur boîte de Roux; lorsque la sporulation, contrôlée par la coloration de Gram, a été intense, on recueille la culture dans un tampon phosphate pH 7,2; la suspension est ensuite portée 10 min à 80 °C pour détruire les formes végétatives.

2.4. — *Méthodes physico-chimiques*

On a mesuré le pH à 20 °C. La stabilité colloïdale a été appréciée par l'épreuve d'ébullition durant 5 min et l'épreuve à l'alcool à 68 p. 100 (v/v). L'épreuve de dénaturation protéique est celle de ASCHAFFENBURG (PIEN, 1972); on a noté le trouble ou la floculation dus aux protéines non dénaturées, ou la limpidité.

Pour apprécier l'effet d'homogénéisation dans la crème, on s'est inspiré de la technique de MUNSTER (1963) : la crème crue ou la crème pasteurisée est placée dans une éprouvette de 250 ml, d'une hauteur de 22 cm, et conservée au réfrigérateur à 5 °C pendant 48 heures. Ensuite, on prélève 25 ml à la partie supérieure et 25 ml au fond; on dose la matière grasse dans les deux parties par butyrométrie. La différence entre les 2 valeurs, en p. 100 de la première donne une appréciation du degré d'hétérogénéité. Un effet d'homogénéisation réduit cette valeur.

La coagulabilité des laits stérilisés a été mesurée avec la présure animale et différentes enzymes coagulantes microbiennes; les concentrations utilisées permettaient de coaguler le lait standard (lait sec « low heat » reconstitué dans $CaCl_2$ 0,003 M, pH 6,5) dans un temps voisin de 5 min, à 32 °C.

Les propriétés rhéologiques ont été mesurées par le « Thrombocord » (LARA) et le pénétromètre VEB-Feinmess équipé du corps pénétrant de SCHALINATUS et BEHNKE (1967).

2.5. — *Dosages chimiques*

L'étude de la répartition des formes de l'azote est basée sur le dosage au micro-Kjeldahl de l'azote total, de l'azote soluble à pH 4,6 et de l'azote non protéique (NPN soluble dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique). On a en outre dosé l'azote dans le sédiment d'ultracentrifugation à 64 000 × g, 30 min.

Le phosphore a été dosé dans le sédiment précédent selon la technique colorimétrique de BAMMAN, NOVOTNY et ROHR (1948); le calcium a été dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique (appareil « Varian-Techtron » AA5) en présence de chlorure de lanthane.

2.6. — *Activités enzymatiques*

Elles ont été mesurées dans le lait cru et dans le lait stérilisé, après différents intervalles de temps, afin de détecter une éventuelle réactivation. Nous avons choisi 5 enzymes se trouvant naturellement dans le lait de vache, en raison de leur intérêt analytique (phosphatase alcaline, lactoperoxydase), technologique (lipase, protéase) ou de propriétés particulières (thermorésistance élevée de la ribonucléase).

L'activité phosphatasique a été mesurée par une méthode usuellement employée dans le contrôle de la pasteurisation, celle de ASCHAFFENBURG et MUELLEN (1949) qui utilise le paranitrophénylphosphate comme substrat, les résultats étant exprimés en μM de paranitrophénol (P.N.P.) libéré ou en pourcentage de réactivation.

L'activité lipasique a été mesurée sur une émulsion de tributyrine à pH 9, 37 °C, 1 h, l'extraction des acides gras et la titration ont été exécutées selon FRAENKEL et TARASSUK (1955). En ce qui concerne l'activité protéolytique, nous avons effectué deux sortes de mesure : *a*) activité liée à la caséine, selon la technique de GED et ALAIS (1976) et *b*) activité globale dans le lait en anaérobiose selon NOOMEN (1975).

L'activité lactoperoxydasique a été recherchée par colorimétrie, en utilisant le gaïacol comme accepteur d'oxygène. Pour la ribonucléase, nous avons choisi comme substrat l'acide ribonucléique de la levure et mesuré les nucléotides libérés par spectrophotométrie à 260 nm, selon KIERMEIER et HUNDT (1969).

2.7. — *État des protéines*

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mettre en évidence les modifications pouvant se produire au cours du chauffage :

a) Changements dans la composition en acides aminés, déterminée par l'autoanalyseur « Technicon » après hydrolyse acide totale.

b) Degré d'hydrolyse par les protéases digestives (pepsine + pancréatine) *in vitro*.

c) État des acides aminés, en particulier de la lysine, mesuré par la dinitrophénylation ou la guanidination.

Les techniques ont été décrites dans la publication de HUMBERT, LORIENT et ALAIS (1976).

III. — Résultats

3.1. — *Bilan bactériologique*

Le tableau 2 présente les résultats des examens pratiqués sur 23 laits et crèmes avant et après stérilisation.

En ce qui concerne les produits soumis à la stérilisation on peut faire les remarques suivantes :

TABLEAU 2

Analyses bactériologiques de laits et de crèmes (1) (nombre de germes/ml)

Produit	Température maximale de chauffage (2) °C	Avant traitement A.T.A.D. microflore totale mésophile × 10³	Avant traitement A.T.A.D. microflore totale thermophile	Avant traitement A.T.A.D. sporulés (3) mésophiles × 10³ (a)	Avant traitement A.T.A.D. sporulés (3) thermophiles	Après traitement A.T.A.D. sporulés mésophiles (b)	Après traitement A.T.A.D. sporulés thermophiles	E.S. (4)	Observations (Produit avant traitement)
Lait n° 1 . .	130 (70)	2 275	25 000	28,75	50	0,55	0,50	4,7	Grand mélange.
Lait n° 2 . .	130 (60)	325	0	5,30	25	0,20	2,50	4,4	Tournée sélectionnée (fromagerie).
—	—								
Lait n° 3 . .	135 (70)	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	3 915		3,30		0,15		4,3	Grand mélange.
Lait n° 4 .	140 (70)	—	—	—	—	—	—	—	
Lait n° 5 . .	140 (70)	7 245	0	21,60	160	0,05	0	5,6	Grand mélange.
Lait n° 6 . .	140 (70)	44 000	12 000	4,40	400	0,15	0	4,5	Conservé à 15°, 24 h.
Lait n° 7 . .	140 (65)	2 175	0	0,43	850	0,15	1	3,4	Grand mélange.
		63 000	0	5,48	20	0,10	0	4,7	Conservé au froid avec léger ensemencement lactique pH 6,4.
Lait n° 8 . .	140 (70)	840	25 000	9,50	150	0,10	0	5,0	Grand mélange.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Lait n° 9 . .	150 (70)	770	0	0,90	0	1,45	0,15	2,8	Écrémé d'usine.
Lait n° 10 .	150 (70)	22 425	0	3,70	170	0,65	0	3,8	Grand mélange.
Lait n° 11 .	150 (70)	9 940	0	6,00	420	0,15	0	4,6	Grand mélange.
Lait n° 12 .	150 (70)	9 600	18 700	15,00	240	0,05	0	5,5	Grand mélange.
Lait n° 13 .	150 (70)	11 060	0	16,75	100	0,20	0	4,9	Grand mélange.
Lait n° 14 .	150 (70)	1 550	25 000	4,70	500	0,05	0	5,0	Grand mélange.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Lait n° 15 .	160 (70)	1 790	25 000	1,60	100	0,05	0	4,5	Grand mélange.
Crème n° 16 .	140 (70)	222	0	0,15	165	0	0	2,2	33 p. 100 MG
Crème n° 17 .	140 (70)	72	0	0,05	100	0,2	0,15	2,4	33 p. 100 MG
Crème n° 18 .	140 (70)	11 930	0	1,57	20	0,15	0,3	4,0	33 p. 100 MG
Crème n° 19 .	140 (70)	5 365	10 000	4,35	750	0,2	0,2	4,3	12 p. 100 MG

(1) Tous les laits et crèmes crus contiennent des anaérobies mésophiles (sauf n° 6) et thermophiles (sauf n° 8, 11 et 13). Après stérilisation l'épreuve est négative dans tous les cas.

(2) (- - -) température de préchauffage.

(3) Germes survivants à 80 °C/10 mn aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs.

(4) Efficacité stérilisante calculée sur les sporulés mésophiles (log a — log b).

(5) Les crèmes n° 18 et 19 sont des crèmes crues; les n° 16 et 17 sont des crèmes d'usine qui ont dû subir une forte pasteurisation.

— La proportion des germes sporulés, mésophiles (aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs) est très variable; elle va de 0,013 à 1,63 p. 100 des germes totaux, soit de 430 à 28 700 /ml dans le lait cru. Dans deux crèmes d'usine on a trouvé des valeurs anormalement basses (n° 16 et 17) consécutives probablement à une forte pasteurisation.

— La microflore totale thermophile (55 °C) paraît être fréquemment nulle (50 p. 100 des cas); cependant, on trouve dans ces laits et crèmes des sporulés thermophiles. Il s'agit peut-être de spores en dormance, qui germent après un choc thermique et en présence de l'amidon contenu dans le milieu utilisé pour dénombrer les sporulés.

— Les sporulés anaérobies (dont la recherche n'est pas mentionnée dans le tableau 2) sont le plus souvent présents dans les produits; on les observe à 30 °C (sauf un) et à 55 °C (sauf trois).

Après stérilisation, à toutes températures, on ne rencontre jamais de germes anaérobies. La quantité de sporulés mésophiles aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs est inférieure à 1 /ml, sauf dans le lait n° 9 qui est un cas particulier; il s'agit d'un lait écrémé d'usine provenant d'un lait entier pasteurisé (cependant, dans ce lait stérilisé, les épreuves de conservation ont été favorables). On remarque que dans 3 cas, il reste plus d'aérobies thermophiles que d'aérobies mésophiles; mais dans la plupart des échantillons la valeur est zéro.

Le contrôle du lait stérilisé porte sur un nombre très faible de germes revivifiables; on peut donc discuter leur signification. Cependant, il faut souligner le fait que des valeurs de l'ordre de 1 correspondent à 20 colonies.

Si l'on calcule l'efficacité de la stérilisation (E.S.), sur la base des sporulés mésophiles, on obtient des valeurs assez élevées, comprises en général entre 4 et 5,6. Si l'on exclut le lait n° 9, pour la raison citée plus haut, il ne reste que les laits n° 6 et 10 pour donner E.S. inférieur à 4; le n° 6 est un lait de grand mélange inhabituellement pauvre en germes sporulés mésophiles. Il en va de même pour les 2 crèmes 16 et 17 qui ont été pasteurisées à l'usine.

Si l'on considère les échantillons de lait, en exceptant le cas particulier du n° 9, on relève des écarts plus ou moins importants de E.S. pour une même température de chauffage : 4,4-4,7 à 130 °C (2 exp.), 3,4-5,6 à 140 °C (4 exp.) et 3,7-4,9 à 150 °C (5 exp.) On peut noter par ailleurs que les valeurs de E.S. se chevauchent entre les différentes températures de traitement.

Pour la crème, l'E.S. augmente de 2,2 à 4,3 avec la température de stérilisation.

3.2. — *Destruction de spores thermorésistantes*

Le tableau 3 rapporte les résultats de l'analyse bactériologique du même lait enrichi en spores (50 000 /ml) et stérilisé à 4 températures différentes. On observe bien le phénomène classique de l'augmentation de E.S. avec la température. Les deux premières valeurs (correspondant à 24 et 12 colonies sur 20 boîtes) sont les plus significatives. La présence de spores anaérobies a été décelée dans le lait chauffé à 130 °C et non pas dans celui chauffé à 135, 140 et 150 °C.

3.3. — *Épreuves de conservation*

Dans tous les essais de stérilisation à 140, 150 et 160 °C, la conservation à 20, 30 et 55 °C a donné des résultats favorables, c'est-à-dire que sur 5 flacons

TABLEAU 3

Stérilisation d'un lait chargé en spores

Température maximale de chauffage °C	Nombre de spores par ml après traitement A.T.A.D.		E.S. (1)	Épreuve de conservation	
	mésophiles (*a*)	thermophiles		30 °C-20 jours	50 °C-10 jours
130	1,2	0,4	4,6	altération	altération
135	0,6	0,2	4,9	inchangé	inchangé
140	0,2	0,1	5,4	inchangé	inchangé
150	0,1	0,0	5,7	inchangé	inchangé

(1) E.S. : log No — log a ; No : nombre de spores de mésophiles avant traitement : 53 000 /ml (dont 50 000 ajoutées).

prélevés à la sortie du stérilisateur, pour chaque température, il n'y avait aucune modification, la variation du pH étant au maximum de 0,12.

A 130 °C, dans 2 essais sur 3, on a observé une altération à toutes les températures de conservation, mais pas dans tous les flacons, à 20 et à 30 °C (78 p. 100 des flacons sont contaminés). L'un de ces laits avait été enrichi en spores (tabl. 3). La stérilité n'a pas été atteinte bien que la valeur de E.S. ne soit pas anormale et que le nombre de germes après stérilisation soit très faible (0,55 et 1,2 mésophiles /ml). Par contre, à 135 °C, la stérilisation a été efficace, mais on ne peut conclure sur un seul essai.

En cumulant l'ensemble des résultats à 140, 150 et 160 °C, indépendamment du produit à traiter, la proportion des flacons non stériles s'élève à 0,77 p. 100; ce qui donne un degré de stérilité de 0,9923.

En dehors des essais mentionnés sur les tableaux 2 et 3, on a pratiqué 23 autres essais de stérilisation (lait, crème, lait additionné d'agents épaississants et gélifiants) à 140 °C et à 150 °C; dans tous les cas la stérilité a été atteinte.

3.4. — *Examens physicochimiques*

3.4.1. *pH*

Un point remarquable est le maintien du pH du lait ou de la crème au cours du traitement A.T.A.D. à différentes températures. Dans 65 p. 100 des cas, il n'est pas du tout modifié; dans les autres cas la variation se fait en plus ou en moins et ne dépasse pas 0,13. On doit noter que les plus forts écarts (+ 0,10 et + 0,13) ont été observés pour les 2 laits conservés pour accroître fortement leur microflore; leur pH a ainsi été élevé de 6,53 à 6,63 et de 6,41 à 6,54 (n° 5 et 7 respectivement).

Les essais comparatifs à l'autoclave ont révélé régulièrement une baisse notable du pH du lait de 0,1 à 0,25, ce qui est l'indice de modifications physicochimiques plus importantes.

3.4.2. *Épreuves de stabilité*

L'épreuve à l'alcool et l'épreuve d'ébullition ont toujours donné un résultat négatif dans les laits stérilisés, ce qui est un résultat normal; mais il faut signaler que quelques laits crus à charge microbienne élevée, ont donné une réaction positive, dénotant une certaine instabilité; ils ont cependant supporté le traitement à 140 et 150 °C.

Le test d'ASCHAFFENBURG appliqué au lait stérilisé par friction donne toujours une réaction positive; à 150 et 160 °C on observe un trouble plus ou moins fort, comme dans des laits de pasteurisation haute; à 130 et 140 °C il y a formation d'un précipité, en général moins important que dans le lait cru correspondant. Les protéines du lactosérum ne sont donc pas complètement dénaturées par le traitement à 150 °C et 160 °C, et ne le sont que très partiellement à 140 °C, bien que la stérilisation soit acquise.

3.4.3. *Examen organoleptique*

a) Couleur : le lait reste d'un blanc pur après stérilisation par friction à toutes les températures, de 130 °C à 160 °C.

Au cours de la conservation à 20 °C (30 j) et 30 °C (20 j) aucun changement de couleur ne se produit. Dans l'épreuve à 55 °C on observe toujours un brunissement du fait de l'accélération des réactions de Maillard.

b) Goût : le lait a été goûté immédiatement après stérilisation et 5 à 7 jours plus tard. En dehors de l'appréciation des 3 opérateurs, on a recueilli celle d'une dizaine de personnes dont une partie était habituée au lait pasteurisé en bouteille de verre, une autre au lait pasteurisé en brique et une troisième au lait de longue conservation (U.H.T. avec conditionnement « Tétrabrik » ou « Rémy-Totalpak »). Ces épreuves ont porté sur les laits stérilisés à 140 °C et 150 °C par friction. Dans tous les cas, le lait a été jugé excellent. Les consommateurs de lait pasteurisé et de lait U.H.T. ont trouvé plus frais, plus « aéré » le lait stérilisé A.T.A.D.

Un cas intéressant est celui du lait n° 5, très chargé en germes mésophiles, qui avait avant son passage dans le stérilisateur A.T.A.D. une odeur et un goût désagréable prononcé (renfermé, vieux... mais non acide); après la stérilisation, le goût ne se distinguait plus de celui des autres laits.

3.4.4. *Effet d'homogénéisation*

Au cours des épreuves de conservation des laits stériles à 20 et 30 °C on a observé une faible formation de crème, qui disparaissait rapidement par agitation.

L'écrémage du lait stérilisé est difficile; dans les conditions habituelles de centrifugation (5 000 × g, 30 mn) la couche de crème ne se forme pas nettement, même après plusieurs passages. Pour obtenir une bonne séparation de la crème, nous avons soumis le lait à un champ centrifuge de 64 000 × g pendant 30 min.

Malgré ce traitement, nous avons observé que de la matière grasse se retrouvait dans le précipité de caséine à pH 4,6 et en quantité d'autant plus grande que la température (donc le temps de passage) était plus élevée. La teneur en substances extraites par les solvants est de 0,34 p. 100 à 130 °C, 1,5 p. 100 à 140 °C et 7,0 p. 100 à 150 °C.

Les examens microscopiques démontrent également l'effet d'homogénéisation; le diamètre moyen des globules gras est abaissé et les écarts en plus ou en moins sont réduits.

Le passage de la crème dans le stérilisateur A.T.A.D. s'est également accompagné d'un effet homogénéisant.

TABLEAU 4

Stérilisation de la crème par friction; effet d'homogénéisation (1)

Matière grasse (%)	Crème		
	Crue	Stérilisée	
		140°	150°
12.	84,0	14,3	25,0
33.	12,1	9,8	—
33.	12,0	0	3,3

(1) Indice d'hétérogénéité; la valeur zéro indique la même teneur en M.G. dans la partie supérieure et dans la partie inférieure de l'échantillon.

Les résultats de l'épreuve butyrométrique se trouvent dans le tableau 4. La crème « légère » à 12 p. 100 avant stérilisation donne une valeur élevée, comme on l'obtiendrait avec le lait; ce qui indique une forte hétérogénéité du produit, au regard de la répartition globulaire. Après le passage dans l'appareil à 140 °C et 150 °C cette valeur est fortement réduite. La crème normale à 33 p. 100 subit également un effet d'homogénéisation plus ou moins prononcé, selon les cas. Lorsque la crème est préalablement homogénéisée à 150 kg, le passage dans l'appareil ne change pas beaucoup la valeur trouvée sans homogénéisation.

3.4.5. *Modification des équilibres salins*

Le dosage du calcium et du phosphore dans le sédiment d'ultracentrifugation (tabl. 5) montre un accroissement progressif de la forme insoluble lorsque la température de la stérilisation par friction s'élève de 130 à 160 °C. On remarque que les valeurs obtenues avec le lait U.H.T. sont voisines de celles obtenues par friction à 140 °C.

3.5. — *Aptitude à la coagulation par les enzymes*

Le tableau 6 présente l'allongement du temps de coagulation résultant du chauffage par 4 préparations enzymatiques utilisées en pratique et la dose de chlorure de calcium nécessaire pour rétablir le temps de coagulation initial (HUMBERT et ALAIS, 1975).

TABLEAU 5

Effets de la stérilisation sur les formes de l'azote, du calcium et du phosphore

	Lait cru (p. 100 du total)	Variations dans les laits stérilisés					
		Par friction				Autoclave (120 °C-20 mn)	U.H.T. (140 °C-2 s)
		130 °C	140 °C	150 °C	160 °C		
Azote soluble à pH 4,6 (fraction non-caséinique, NCN).	23	— 5,8	— 8,4	— 9,8	— 10,8	— 11,5	— 10,0
Azote non protéique (NPN) (sol. 12 p. 100 TCA)	5	+ 0,3	+ 0,5	+ 0,7	+ 0,9	+ 1,7	+ 0,8
Azote du sédiment (*)	48	+ 12,7	+ 14,5	+ 17,0	+ 18,3	+ 21,7	+ 17,2
Calcium du sédiment	51	+ 6	+ 8	+ 23	+ 10	+ 35	+ 8,5
Phosphore du sédiment	43	+ 7	+ 8	+ 13	+ 21	—	+ 8

(*) Sédiment à 64 000 × g, 30 mn.

TABLEAU 6

Aptitude à la coagulation par les enzymes après le traitement thermique (*)

Traitement	Présure animale	Endothia parasitica	Mucor pusillus	Mucor miehei
Pasteurisation, 73°-20 s .	1,2 (1,4)	—	1,1	1,1
Pasteurisation, 90°-20 s .	1,6 (2,1)	1,4 (2,0)	1,6 (2,2)	1,5 (2,0)
U.H.T., 140°-2 s.	n.m. (8,1)	n.m. (8,1)	n.m. (8,0)	n.m. (8,0)
Stérilisation, 120°-15 mn .	n.m. (9,5)	n.m. (9,0)	n.m. (9,5)	n.m. (8,0)
Stérilisation A.T.A.D. :				
— 130°	2,1 (3,1)	2,4 (3,2)	3,0 (3,2)	2,45 (3,0)
— 140°	4,0 (3,1)	3,5 (3,2)	3,85(3,2)	3,45 (3,0)
— 150°	5,3 (3,1)	— —	4,7 (3,2)	4,5 (3,0)
— 160°	n.m. (5,0)	n.m. (5,0)	n.m. (3,2)	n.m. (3,0)

(*) Rapport : temps de coagulation après traitement/temps de coagulation du lait cru.
n.m. : non mesurable; le lait traité n'est pas coagulé après 2 heures (les doses d'enzyme sont choisies pour coaguler le lait cru en 4 à 5 minutes à 32 °C).
Entre parenthèse : mM de $CaCl_2$ pour rétablir le temps de coagulation initial.

Contrairement à ce qui se passe pour les autres procédés de coagulation, le traitement A.T.A.D. de 130 à 150 °C ne rend pas le lait incoagulable; le facteur d'allongement varie de 2 à 5 environ. Pour la stérilisation U.H.T. industrielle et la stérilisation classique, la dose de chlorure de calcium à ajouter est élevée : 8 à 9 mM;

pour les laits stérilisés A.T.A.D. 130-150 °C elle se trouve autour de 3 mM, soit une quantité un peu supérieure à 30 g /100 l de lait, ce qui est utilisable en pratique.

L'indice rhéologique K_{20} (temps écoulé après la coagulation pour atteindre un écartement de 20 mm des branches du diagramme) du lait emprésuré augmente, du fait du traitement A.T.A.D., plus fortement que le temps de coagulation; donc le raffermissement est plus lent; cependant, la fermeté après 30 min d'emprésurage augmente un peu moins que le temps de coagulation. L'addition de chlorure de calcium a une forte influence sur les paramètres rhéologiques; avec 3 mM, l'aptitude à la coagulation du lait stérilisé à 140 °C est rétablie.

Les essais en fromagerie de pâte molle, avec 30 g de chlorure de calcium /100 l de lait, ont montré que le lait stérilisé A.T.A.D. à 150 °C donne de mauvais résultats; à 140 °C le caillé peut être moulé mais sa qualité est médiocre; à 130 °C on a obtenu des fromages comparables à ceux d'une fabrication normale en lait pasteurisé (Humbert et Alais, 1976).

3.6. — *Modification des protéines*

Le tableau 5 montre que la variation des fractions azotées est continue de 130 à 160 °C au cours de la stérilisation A.T.A.D. (Humbert, Lorient et Alais, 1976). La stérilisation U.H.T. (140 °C, 2 s) donne des résultats correspondant au traitement A.T.A.D. entre 150 et 160 °C; or ce dernier assure la stérilisation à 140 °C; il modifie donc moins les protéines du lait. Si nous considérons les 3 conditions de stérilisation, la proportion de substances protéiques précipitant à pH 4,6 (caséine + protéines du lactosérum dénaturées) est de :

— 77 p. 100 avec le lait cru,
— 85,4 p. 100 avec le lait stérilisé A.T.A.D. 140 °C,
— 87 p. 100 avec le lait stérilisé U.H.T.,
— 88,5 p. 100 avec le lait stérilisé à l'autoclave.

L'analyse des acides aminés du précipité à pH 4,6 ne révèle que des modifications peu importantes après le traitement A.T.A.D. Il n'y a pas de baisse globale de la teneur en acides aminés comme cela se produit au cours de traitements plus sévères.

L'étude de la digestion du lait et de la caséine par la pepsine et la pancréatine montre que le traitement A.T.A.D. à 140 °C permet une meilleure libération de la plupart des acides aminés que le procédé U.H.T. et surtout que la stérilisation à l'autoclave; cette dernière inhibe fortement la libération.

La disponibilité de la lysine a été étudiée de trois manières : libération par les enzymes, guanidination et dinitrophénylation (Humbert, Lorient et Alais, 1976). L'hydrolyse enzymatique a été réalisée avec la pepsine et la pancréatine. On observe une augmentation de la lysine libérée, par rapport au lait cru, donc un démasquage de cet acide aminé, par la stérilisation A.T.A.D. à 140 et 150 °C, du même ordre que par la pasteurisation ou le traitement U.H.T. (+ 0,8 ou + 0,9 g lysine /16 g N). Curieusement, à 130 °C, on note un léger blocage (— 0,33). La stérilisation classique provoque un fort blocage de la lysine (— 1). Les mêmes essais pratiqués sur la caséine extraite du lait stérilisé A.T.A.D. révèlent une diminution sensible de la lysine libérée, mais qui va en réduisant avec la température.

Les deux méthodes chimiques donnent la quantité de lysine non réactive. Les résultats obtenus à partir des laits chauffés ne sont pas concordants. La guani-

dination ne révèle que de faibles changements; la dinitrophénylation révèle un accroissement de la lysine non-réactive dans la plupart des cas. Avec les caséines issues de ces laits, tous les résultats sont concordants et vont dans le sens de ceux de l'hydrolyse enzymatique; la lysine bloquée augmente après chauffage.

En ce qui concerne l'arginine et la tyrosine, les variations de la teneur mesurée par dinitrophénylation sont identiques à celles de la lysine.

3.7. — *Propriétés électrophorétiques*

La figure 6 présente deux séries de diagramme d'électrophorèse des fractions protéiques provenant d'un lait cru, du même lait stérilisé par le procédé A.T.A.D. à 140 (*I*) et à 150 °C (*II*) et du même lait autoclavé. « R » désigne la caséine de référence préparée au laboratoire à partir d'un lait cru de grand mélange.

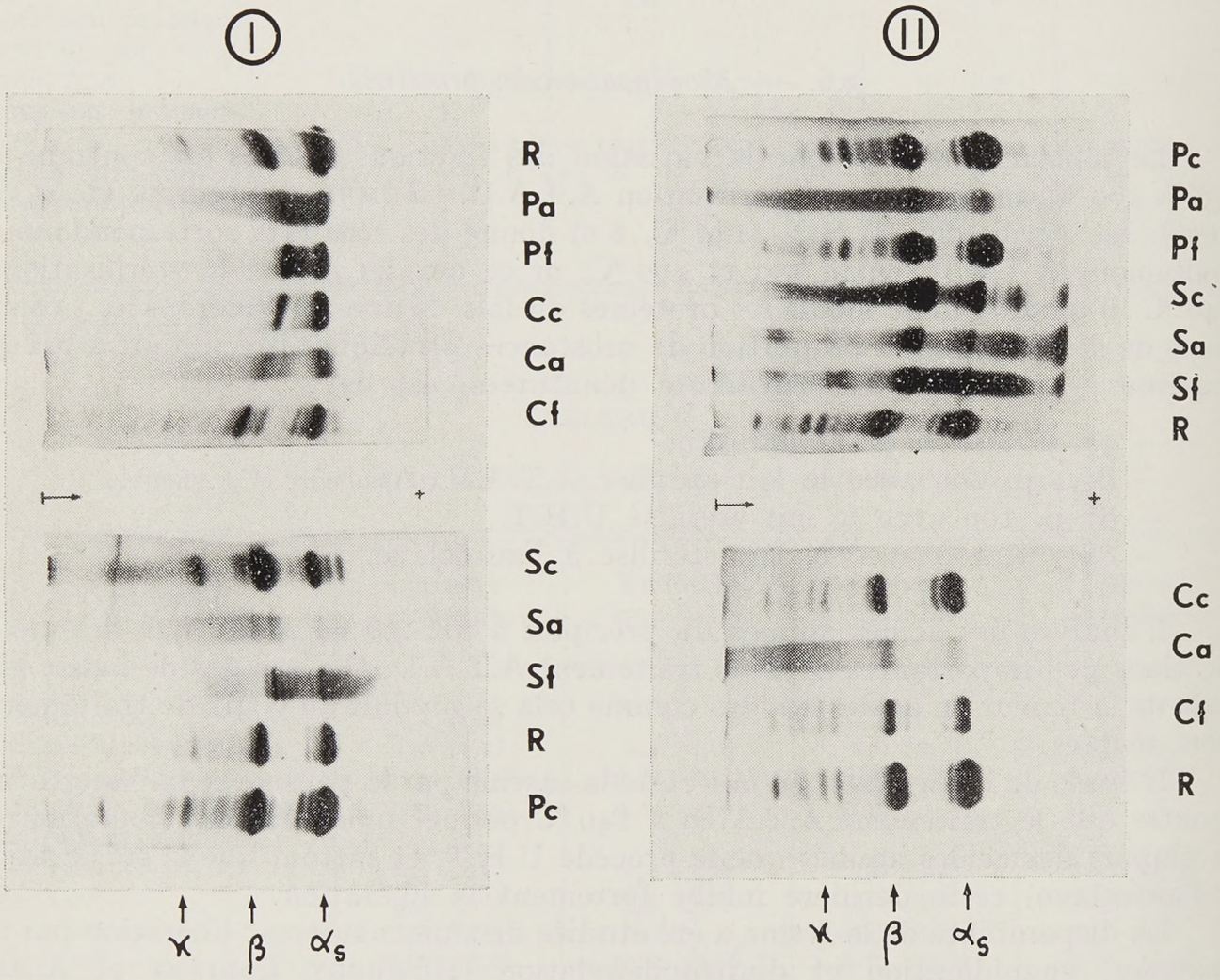


FIG. 6. — *Électrophorèse en gel d'amidon à pH 8,6 (urée 7M, mercapto-éthanol 0,03 M) du lait stérilisé par friction à 150 °C (I) et 140 °C (II), ainsi que du lait cru et du lait autoclavé.*

P : précipité à pH 4,6.
C : culot de centrifugation (64 000 g, 30 mn).
S : sérum à pH 4,6.
R : caséine de référence.
c : lait cru.
f : lait stérilisé par friction.
a : lait stérilisé à l'autoclave.

Les fractions insolubles : précipité à pH 4,6 et culot d'ultracentrifugation, obtenues à partir du lait autoclavé, donnent le plus souvent les images caractéristiques des protéines fortement chauffées en solution, avec des traînées, des colo-

rations irrégulières ou des disparitions de bandes, qui sont les conséquences de dénaturation et de dégradation, avec modification de l'aptitude à fixer les colorants. Il s'agit ici d'un colorant acide, le noir amido, qui se lie aux chaînes latérales basiques des protéines.

Ces mêmes fractions insolubles, obtenues à partir du lait stérilisé par friction, donnent des images se rapprochant de celles du lait cru. Dans l'expérience (*I*) le nombre et la disposition des bandes sont presque identiques dans les deux échantillons. Par contre, dans l'expérience (*II*) on observe une bande supplémentaire entre celles des caséines α_s et β; approximativement dans la position de la β-lactoglobuline, qui serait donc plus dénaturée dans ce traitement.

En ce qui concerne les fractions solubles à pH 4,6, on note la différence caractéristique entre les 3 sérums de l'expérience (*II*). Dans le sérum autoclavé l'image est confuse. Dans l'expérience (*I*), l'échantillon du sérum A.T.A.D. a été un peu surchargé, mais la bande lente de la sérumalbumine indique une dénaturation limitée.

3.8. — *Effet des traitements thermiques sur l'activité des enzymes*

Les résultats obtenus avec deux des cinq enzymes étudiées, la phosphatase alcaline et la protéase, ont été précédemment publiés (Ged et Alais, 1976, *a*, *b*).

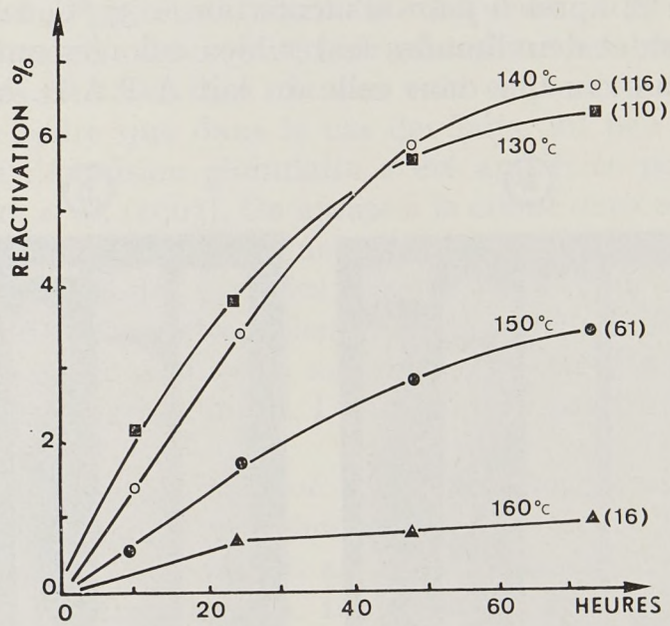


Fig. 7. — *Réactivation de la phosphatase alcaline dans le lait stérilisé par friction en fonction de la durée de conservation à 34 °C.* (...) *Activité phosphatasique à 72 heures, en µM de paranitrophénol/ml de lait.*

Après tous les traitements thermiques appliqués, l'activité phosphatasique du lait est nulle; elle le reste au cours de la conservation à 34 °C dans le lait U.H.T. et le lait stérilisé classique. La stérilisation A.T.A.D. à 130 et 140 °C permet une réactivation notable; elle est plus faible à 150 °C et très faible à 160 °C. Les courbes de la figure 7 résument ces résultats avec l'indication de la valeur absolue de l'activité après 72 h.

Une activité protéolytique persiste après stérilisation A.T.A.D. du lait à 130, 140 et 150 °C, d'autant plus grande que la température est plus basse; à 160 °C l'activité résiduelle est faible, à peu près comme dans le lait U.H.T. Aucune acti-

vité n'a été décelée dans le lait stérilisé à l'autoclave. Le tableau 7 montre que les valeurs relatives sont très voisines, qu'il s'agisse de l'activité liée à la caséine ou de l'activité globale dans le lait, en présence d'un antiseptique.

TABLEAU 7

Activité protéasique persistant dans le lait stérilisé (*)

	Activité dans le lait (incubation en anaérobiose)	Activité liée à la caséine
Stérilisation A.T.A.D. :		
130 °C	80	75
140 °C	65	67
150 °C	43	35
160 °C	5	20
U.H.T. (140 °C, 2 s)	5	15
Autoclave (115 °C, 20 mn)	0	0

(*) Activité relative par rapport au lait cru = 100, à 37 °C en 12 j.

Les examens électrophorétiques ont montré que la protéolyse se produit aux dépens de la caséine β; après 6 jours d'incubation à 37 °C, la bande β a presque complètement disparu et deux bandes lentes bien colorées ont apparu, aussi bien dans la caséine du lait cru que dans celle du lait A.T.A.D. à 130, 140 et 150 °C (fig. 8).

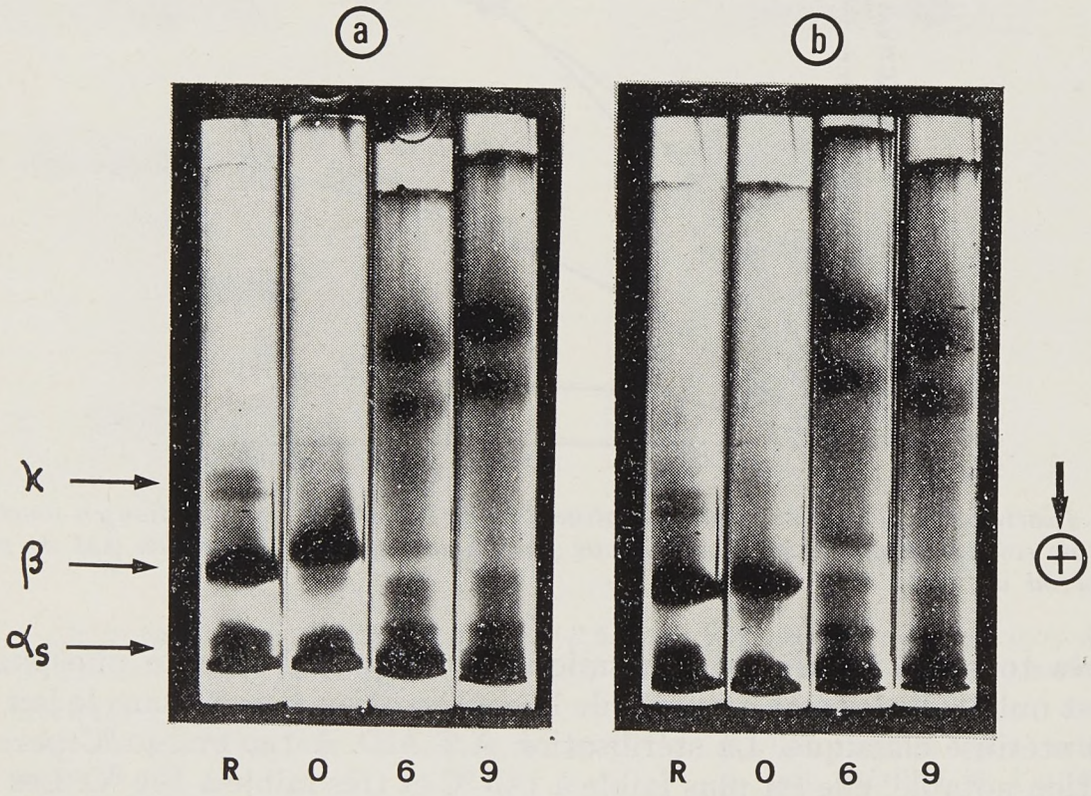


FIG. 8. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8,5 des caséines du lait cru* (a) *et du lait stérilisé par friction à 140 °C* (*b*).
R : caséine de référence.
O : examen après la mise en solution.
6 : examen après 6 jours d'incubation.
9 : examen après 9 jours d'incubation.

Le traitement A.T.A.D. de même que les autres traitements, entraîne la disparition totale de l'activité peroxydasique et de l'activité lipasique. Aucune réactivation n'a pu être mise en évidence au cours de la conservation à 4 et à 37 °C.

En ce qui concerne l'activité ribonucléasique, on a observé non seulement une persistance, mais un accroissement après la stérilisation A.T.A.D. à 130, 140 et 150 °C; les valeurs relatives étant respectivement 123, 133 et 145. La stérilisation A.T.A.D. à 160 °C et le procédé U.H.T. provoquent au contraire une chute d'activité (90 et 86); le passage à l'autoclave provoque une réduction plus forte.

3.9. — *Stérilisation de produits divers*

3.9.1. *Crèmes*

Huit essais de stérilisation par friction ont été réalisés : 4 à 140 °C et 4 à 150 °C; la moitié de ces essais a été faite sur des crèmes homogénéisées à 150 kg/cm². Dans tous les cas, les épreuves de contrôle de stérilité (analyse bactériologique, test de conservation et mesure du pH) ont été favorables. Comme pour le lait, la stérilité est atteinte par passage à 140 °C (après préchauffage à 70 °C).

Dans le tableau 2 ont été présentés les examens bactériologiques de 4 crèmes, une crème légère à 12 p. 100 de M.G. (n° 19) et 3 crèmes à 33 p. 100. Les crèmes n° 16 et 17 ont subi une pasteurisation haute à l'usine, dont nous ne connaissons pas les paramètres exacts; de ce fait, leur microflore est bien différente des précédentes. Les crèmes n° 18 et 19 n'ont pas subi ce traitement; l'efficacité stérilisante est du même ordre que dans le cas des laits, un peu supérieure à 4.

La stabilité de l'émulsion globulaire a été appréciée par la méthode colorimétrique de SCHULTZ *et al.* (1963). On ajoute à la crème deux substances colorantes, l'une, le soudan-III est liposoluble et ne colore en rouge que la matière grasse libre séparée après destruction des globules; l'autre, le bleu de méthylène colore en bleu clair la couche de crème et en bleu foncé la couche inférieure de lait écrémé. Dans aucun cas nous n'avons observé, avant ou après stérilisation à 140 ou à 150 °C la séparation de matière grasse libre. Le traitement par friction ne provoque pas de destabilisation.

L'effet d'homogénéisation observé après le passage de la crème dans l'appareil A.T.A.D. a été mentionné plus haut. Malgré cet effet (mesuré à 5 °C), on a observé la séparation de deux phases au cours de la conservation à 30 et à 55 °C (pas à 20 °C) de deux crèmes à 33 p. 100 de M.G., non homogénéisées; la partie inférieure paraît plus claire et la partie supérieure plus opaque; après une simple agitation le mélange redevient homogène. L'homogénéisation préalable à 150 kg réduit cette séparation. La crème légère stérilisée, homogénéisée ou non, n'a pas présenté cette modification physique.

Le pH de la crème ne varie presque pas du fait de la stérilisation; comme dans le cas du lait, les écarts sont très faibles. La couleur et le goût de la crème n'ont subi aucune modification après la stérilisation.

Nous avons analysé une crème conditionnée en berlingot (Tétra Pak) de 14 g, stérilisée par le premier appareil A.T.A.D. mis en service normal dans une usine en Autriche. Après une durée de 2 ans, cette crème était en parfait état et aucune contamination n'a été observée.

3.9.2. *Laits additionnés d'amidon*

Pour la préparation des laits gélifiés on emploie couramment, en plus des arômes et du sucre (12 à 14 p. 100), une association d'un agent épaississant, l'amidon (1,5 à 2 p. 100) et d'un agent gélifiant, le carraghénate (0,3 à 0,4 p. 100).

Nous n'avons pu faire des essais de stérilisation qu'avec l'amidon, pour des raisons techniques. Nous avons utilisé les deux produits suivants :

— « Fleurine 03433 », amidon de maïs natif, contenant environ 27 p. 100 d'amylose et 73 p. 100 d'amylopectine; il possède une viscosité moyenne à chaud et rétrograde à froid.
— « Snowflakes » 03842, également amidon natif mais formé d'un mélange de maïs cireux et de maïs ordinaire; il est plus pauvre en amylose que le précédent; il est plus visqueux à chaud et rétrograde peu à froid.

La formulation a été la même pour les deux produits :

— Amidon	18 g
— Sucre cristallisé	120 g
— Lait entier	1 l

La mise en solution a été faite de deux manières :

a) Pour un bidon de 20 l, on ajoute le mélange à sec de sucre (2,4 kg) et d'amidon (0,36 kg) dans 4 l de lait chauffé à 80 °C; on agite pendant 10 min et on complète à 20 l par du lait à 80 °C; le liquide est immédiatement pompé dans le bac du stérilisateur.

b) L'amidon et le sucre sont dispersés dans le lait froid et le mélange est porté à 70 °C sous vive agitation, puis pompé dans le bac.

La stérilisation a été faite à 140 et à 150 °C suivie d'un refroidissement à 20 °C.

Les mêmes épreuves de contrôle de la stérilité que dans le cas du lait ont été utilisées ici. La stérilité a été atteinte aussi bien à 140 °C qu'à 150 °C.

Avec la première technique de mise en solution, il se forme lentement au cours de la conservation à 20 et 30 °C un dépôt mou, pâteux; lorsqu'on incline les flacons, ce dépôt se déforme un peu plus lentement que le liquide. Une simple agitation suffit à le disperser et à obtenir un liquide homogène, blanc, d'apparence et de goût normaux. Les deux amidons se comportent de la même façon.

Avec la deuxième technique, le dépôt est à peine visible; ce moyen de dispersion est donc plus favorable.

Un examen chromatographique rapide, en couche mince, a été pratiqué sur le surnageant à pH 4,6; il n'a pas révélé la présence de glucose, de fructose, ni de maltose qui aurait indiqué une hydrolyse de l'amidon ou du saccharose.

IV. — Discussion et conclusions

L'étude bactériologique a été orientée dans un but précis : savoir si l'appareillage A.T.A.D. se comporte réellement comme un stérilisateur? Malgré la mise en œuvre de moyens analytiques assez importants, on ne peut la considérer comme une étude définitive de ce procédé. En particulier, il serait souhaitable de faire de nouvelles expériences avec la souche de *Bacillus coagulans*, dans les conditions

précisées par HERMIER, BEGUE et CERF (1975) pour la détermination de l'efficacité des stérilisateurs de type U.H.T.

La stérilité du lait, de la crème, du lait additionné d'agent épaississant a toujours été obtenue à la température de 140 °C à la sortie de la turbine, ce qui implique une durée de 0,54 s à cette température pour un préchauffage à 70 °C. La chute de température de 140 à 98 °C est instantanée. Ces conditions de chauffage se situent en-dessous de celles admises en général pour le traitement U.H.T. industriel. On connaît le débit mais non pas le cheminement exact de chaque particule du produit traité dans l'entrefer; cependant, les résultats obtenus peuvent être interprétés dans le sens d'une grande homogénéité du traitement thermique.

Pour expliquer la bonne efficacité de cet appareillage, ses promoteurs ont mis en avant l'idée que des effets mécaniques se superposeraient à l'effet purement thermique. L'effet d'homogénéisation que nous avons observé soutient cette idée; il faut bien considérer l'étroitesse de l'entrefer (0,3 mm) et l'augmentation de pression due à la force centrifuge (14 kg/cm^2). Cependant, les effets de « laminage » pouvant toucher les micelles et cellules au cours de l'homogénéisation n'ont été étudiés qu'avec des pressions beaucoup plus élevées.

Une récente étude de DAUDIN et CERF (1977) a montré la réalité du « choc thermique » lorsque les échanges thermiques sont extrêmement rapides, comme lorsque le chauffage est réalisé par mélange de vapeur. La destruction des spores de *Bacillus coagulans* est plus forte que prévu par le calcul basé sur leur thermorésistance en ampoule. Un tel choc pourrait se produire dans le traitement A.T.A.D. d'où l'intérêt de nouvelles expériences.

L'efficacité stérilisatrice, calculée sur la base des sporulés mésophiles au cours de 23 essais de stérilisation de laits et de crèmes est en général comprise entre 4,0 et 5,6. Elle croît faiblement avec l'intensité de traitement et présente des chevauchements d'une température de stérilisation à une autre. Il en résulte des écarts notables entre les valeurs de E.S. pour une même température : ceci n'est pas anormal car ces différences reflètent les variations en nombre de la fraction des spores les plus résistantes. L'efficacité stérilisatrice de l'appareil A.T.A.D. déterminée directement par le traitement de produits variés est voisine de 5; elle est inférieure à celle du traitement U.H.T. qui est estimée à 8 dans le cas des spores de *Bacillus subtilis*. La technique utilisée pour le dénombrement, qui surestime les survivants et par conséquent sous-estime la valeur de E.S., ne suffit pas à expliquer cette différence entre les deux procédés pour une même température; en fait la plus faible durée du traitement A.T.A.D. semblerait en être l'explication.

Le lait traité A.T.A.D. apparemment stable, contient un nombre relativement élevé de spores dénombrables dans un milieu de culture, mais qui sont en fait suffisamment endommagées par le traitement pour ne plus pouvoir se développer dans le lait; le phénomène est connu dans le cas du traitement U.H.T. uniquement pour des spores de thermophiles. Il y a là une originalité indiscutable en faveur du traitement A.T.A.D.

La stérilité est irrégulièrement atteinte avec le traitement A.T.A.D. à 130 °C (6 expériences). D'un flacon de lait altéré on a isolé une souche présentant les caractères généraux de *Bacillus cereus ;* elle nous a servi pour une étude limitée de thermorésistance et pour un contrôle de l'efficacité stérilisatrice. Dans ce cas, les valeurs de E.S. sont légèrement plus élevées que dans le cas des laits non-surchargés en spores, ce qui confirmerait la sous-estimation de E.S. et laisserait supposer que la thermorésistance de la souche de *Bacillus cereus* utilisée n'était que relative.

La valeur limite du taux de flacons conservés non-stériles, indépendamment du produit traité et de la température assurant la stérilisation, est inférieure à

1 p. 100. Ce résultat peut être considéré comme satisfaisant pour des essais au laboratoire dans nos conditions de prélèvement : hotte aseptique quelque peu précaire et avec des flacons de 250 ml, mais il le serait moins si les flacons contenaient 1 000 ml de lait. En effet, le degré de stérilité apporté par une opération unitaire dépend à la fois de son efficacité stérilisatrice, de la contamination initiale et du volume des flacons (CERF, 1976).

Sur le plan des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques le traitement A.T.A.D. peut être considéré comme particulièrement doux. Le maintien du pH après traitement et l'absence complète d'altération de goût et de couleur, jusqu'à 150 °C, sont significatifs. La notation de goût « plus aéré » par plusieurs dégustateurs, est à souligner.

Différents examens montrent que les protéines solubles ne sont que partiellement dénaturées à 140 °C (et même 150 °C). Le test d'ASCHAFFENBURG ne convient pas pour distinguer le lait stérilisé par ce moyen du lait pasteurisé.

Les modifications de la partie protéique du lait stérilisé A.T.A.D. à 140 °C sont plus légères que celles subies au cours de la stérilisation U.H.T. à 140 °C/2 s, malgré le faible écart en température et en temps existant entre ces deux traitements. Ces modifications ont été précédemment discutées en détail (HUMBERT, LORIENT et ALAIS, 1976) et on a souligné le fait que la lysine garde une disponibilité presque totale après le traitement A.T.A.D. à 140 °C. De nouveaux arguments peuvent être tirés des résultats des examens électrophorétiques dont deux exemples ont été présentés dans cette communication. Deux observations sont à signaler : l'aptitude à fixer les colorants diminue ou même disparaît lorsque le traitement thermique a été assez fort pour modifier les chaînes latérales des acides aminés qui sont les sites de liaison; en outre, la dénaturation et la dégradation des protéines chauffées modifient la mobilité des constituants et font apparaître des images caractéristiques (LORIENT et ALAIS, 1974); les protéines des laits stérilisés A.T.A.D. à 140 et 150 °C donnent des images normales ou peu modifiées.

L'aptitude à la coagulation enzymatique du lait est une épreuve très significative en ce qui concerne l'état des protéines et les déplacements de l'équilibre salin consécutifs au chauffage. La stérilisation à l'autoclave ou la stérilisation U.H.T. à 140 °C/2 s rendent le lait pratiquement incoagulable. Par contre, le traitement A.T.A.D. à 140 °C allonge de 3 à 4 fois le temps de coagulation et une addition de 3 mM de chlorure de calcium ramène les paramètres rhéologiques à la valeur initiale, dans le lait cru, ce qui permet l'utilisation fromagère (HUMBERT et ALAIS, 1975 et 1976).

Les activités enzymatiques existant dans le lait subissent des modifications variées, selon le type de chauffage. Nous avons observé que la lactopéroxydase et la lipase sont complètement et irréversiblement dénaturées dans le traitement A.T.A.D. comme dans les autres traitements. Il n'en va pas de même pour 3 autres enzymes, dont les modifications moléculaires sont plus limitées dans le traitement A.T.A.D. La phosphatase alcaline se réactive progressivement; à 140 °C le taux de réactivation est assez élevé, près de 6 p. 100 après 48 h; dans les mêmes conditions, il n'y a pas de réactivation dans le lait stérilisé U.H.T. (140 °C, 2 s) ni dans le lait autoclavé (GED et ALAIS, 1976*a*). Une protéase dégradant la caséine β existe dans le lait, peut être identique à la plasmine. Elle se révèle assez thermorésistante au cours du traitement A.T.A.D. en-dessous de 160 °C, mais non pas dans les autres laits stérilisés (GED et ALAIS, 1976*b*). La thermorésistance de la ribonucléase est bien connue; mais au cours du traitement A.T.A.D. à 130, 140 et 150 °C on a observé une activation; peut être s'agit-il de la destruction d'un inhibiteur thermolabile?

La stérilisation de la crème par ce procédé ne pose aucun problème si l'on pratique l'homogénéisation de la crème à 33 p. 100 de M. G. La stérilisation du lait additionné de sucre et d'amidon est aisée. Nous n'avons pas pu traiter des laits enrichis en protéines du sérum et additionnés de carraghénate pour faire des produits gélifiés, comme cela était prévu au programme, par suite d'une difficulté de réglage de la température dans le réfrigérant dont nous disposions. Mais une industrie pharmaceutique a mis au point la stérilisation par friction de produits spéciaux de ce type avec un appareil UF-400.

En conclusion, on peut considérer le traitement A.T.A.D. comme un procédé de choix pour la stérilisation de produits alimentaires possédant une certaine valeur dans un pays comme la France où l'énergie électrique est assez coûteuse. La construction d'appareils de plus grand débit changerait les données du problème (un appareil UF-700 était en préparation lorsque la Sté SEFFAC a dû cesser ses activités). Quoi qu'il en soit, un développement des recherches sur les plans mécanique, bactériologique et biochimique, avec notamment une étude des vitamines, est très souhaitable.

Reçu pour publication en juin 1978.

Remerciements

Ces recherches ont été effectuées grâce à l'aide financière de la D.G.R.S.T. (contrats 73.7.1398 et 75.7.0383). Nous remercions la Sté SEFFAC pour la mise à disposition du stérilisateur A.T.A.D. et le Département de Biologie Appliquée de l'I.U.T. de Nancy pour les facilités techniques qu'il nous a offertes.

Nous remercions vivement M. J. Hermier, Directeur du Département de Technologie des Produits Animaux (C.N.R.Z. /I.N.R.A.; Jouy-en-Josas) pour ses précieux conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.

Summary

Bacteriological and biochemical studies on the A.T.A.D. process for the sterilization by friction of dairy products

The A.T.A.D. process allows the sterilization of food fluids in a very short time, without heat exchange nor steam mixing. Heat is produced by friction between a disc which rotates in a stator with a very narrow clearance (0,3 mm). The liquid enters through the apparatus near the hub and it goes out at the periphery. An increase of 70 °C in temperature is obtained in about half a second, with an increase of pressure till 14 kg /cm². The flow rate depends on the ΔT (usually the liquid to be sterilized is quickly preheated at 70 °C), the disc diameter (300 to 700 mm) and the rotor speed. The sterilizer is made in special stainless steel. Some thermal problems are mentionned in this publication.

We have studied various characteristics of the A.T.A.D. treatment applied to some dairy products, using such technics in order to solve 2 problems: 1) had the A.T.A.D. apparatus the behaviour of a right sterilizer under practical conditions? and 2) what are the physicochemical and biochemical modifications that occurs during the treatment?

The pilot plant UF-300 was worked out during 2 years without any mechanical difficulty. We realized 41 experiments with milk, cream at 12 or 33 p. 100, milk loaded by bacterial spores and milk containing thickening agent. The sterility, determined by the stability of milk at 30 °C, was always attained at 140 °C /0.54 s (preheating 70 °C). However, the sterilizing effenciency (S.E.), calculated on the basis of mesophilic sporulated bacteria, was about 4.8 at 140 °C and 5.0 at 150 °C /0,82 s. The feeble increase of S.E. in function of temperature can be explained by the used analytical methods which bring an overestimation of surviving bacteria.

The A.T.A.D. treatment does not alter the organoleptic characteristics of the products; some flavor improvements have been observed. The physico-chemical properties are little

modified. We observed an homogeneising effect on the fat globules; the cream does not undergo any destabilization. The milk with added sugar and starch is easily sterilized.

With U.H.T. treatment (140 °C/2 s) and conventional sterilization, the milk is practically unfit fort clotting by animal nor fungal rennets; on the other hand sterilization by friction at 140 °C increases only moderately the clotting time. The rheological parameters become again normal with added 3 mM calcium chloride. Camembert production is possible in this way; this process is convenient for canned cheese.

The changes in the nitrogen distribution by A.T.A.D. treatment at 140 °C are small by comparison with oder thermic treatments. The enzymatic and chemical methods used to evaluate the protein digestibility and the state of aminoacids in the sterilized milk and in its casein confirm that this treatment had mild secondary effects. The greatest part of the lysin remains available.

Concerning the milk enzyms we can consider three cases:

— total and irreversible inactivation of lactoperoxydase and lipase in all treatments;

— limited molecular modification by the A.T.A.D. treatment: inactivation followed by reactivation (till 6 p. 100) of alkaline phosphatase; persistance of a proteolytic activity;

— activation of ribonuclease by the A.T.A.D. treatment.

The A.T.A.D. treatment is very interesting for dairy industry. It require new researches on the bacteriological and biochemical levels, mainly for appreciating the efficiency with the *Bacillus coagulans* strain of HERMIER, BEGUE and CERF (1975) and for evaluating the vitamins content.

Références bibliographiques

ANGUE R., WANDER R. (Sté A.T.A.D.), 1967. Procédé thermique de stérilisation en continu et dispositif de mise en œuvre. Brevet Invent. Fr. n° 1 558 513.

ANGUE R., WANDER R. (Sté A.T.A.D.), 1967. Procédé de stérilisation ou de pasteurisation sans apport externe de chaleur. Brevet invent. Fr. n° 1 557 088.

A.T.A.D. Sté, 1971. Certificat d'addition au brevet n° 1 557 088.

ASCHAFFENBURG R., MUELLEN J. E. C., 1949. Rapid and simple phosphatase test for milk. *J. Dairy Res.*, **16**, 58-67.

BAMAN E., NOVOTNY E., ROHR L., 1948. Bestimmung der Phosphosaüre. *Chem. Ber.*, **81**, 438-440.

CERF O., 1976. Le conditionnement aseptique du lait : questions sur la microbiologie de l'emballage. *Rev. Laitière Française*, **340**, 149-156.

DAUDIN J. D., CERF O., 1977. Influence des chocs thermiques sur la destruction des spores bactériennes par la chaleur. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **10**, 203-207.

FRAENKEL E. N., TARASSUK N. P., 1955. An extraction-titration method for the determination of the free fatty acids in rancid milk and cream. *J. Dairy Sci.*, **38**, 751-754.

GED J., ALAIS C., 1976*a*. Étude de la réactivation de la phosphatase alcaline dans le lait stérilisé par friction. *Lait*, **56**, 407-413.

GED J., ALAIS C., 1976*b*. Activité protéasique persistant dans les laits stérilisés. *Lait*, **56**, 645-656.

HERMIER J., BEGUE P., CERF O., 1975. Relationship between temperature and sterilizing efficiency of heat treatments of equal duration. Experimental testing with suspensions of spores in milk heated in an ultra-high-temperature sterilizer. *J. Dairy Res.*, **42**, 437-444.

HUMBERT G., ALAIS C., 1975. Aptitude à la coagulation enzymatique de laits ayant subi différents traitements thermiques. *Rev. Laitière Française*, **337**, 793-797.

HUMBERT G., ALAIS C., 1976. Aptitude à la coagulation enzymatique de laits stérilisés par friction. II. Aspects rhéologiques et fabrication de fromages. *Rev. Laitière Française*, **344**, 407-411.

HUMBERT G., LORIENT D., ALAIS C., 1976. Modifications de la partie protidique du lait dans la stérilisation par friction. *Lait*, **56**, 261-274.

KIERMEIER F., HUNDT D., 1969. Uber die Ribonuclease der Milch. *Z. Lebensm. Unters. und Forsch*, **141**, 76-86.

LORIENT D., ALAIS C., 1974. Dégradation thermique des caséines α_s et β de vache. II. Modifications des propriétés physicochimiques. *Biochimie*, **56**, 667-673.

MUNSTER M., 1963. Die Homogenisierung von Milch und Milcherzeugnissen. Deutsche. *Molkerei Zeitung*, **84**, 66-69.

NOOMEN A., 1975. Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 153-161.

PIEN J., 1972. Aspects chimiques et physicochimiques de la technologie des laits U.H.T. — Contrôle de Laboratoire. in « Monographie sur le lait U.H.T. » *Bulletin Annuel FIL-IDF*, partie V, 35-58.

SCHALINATUS E., BEHNKE U., 1967. Untersuchungen zur Wirkung von Labpräparaten verschiedener Herkunft. 2. Festigkeit und Schrumpfung des Bruches. *Milchwissesnchaft*, **22**, 601-608.

SCHULZ M. E., BEYERLEIN U., THIELE D., 1968. Rahm-Zentrifugat — Färbe-methode zur Bestimmung des Freien Fettes und Aufrahmungsvermögens von Rahm. *Milchwissenschaft*, **23**, 473-476.

21

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 767-781.

Influence du chlorure de sodium, du pH et du chauffage sur quelques propriétés de protéines de tournesol filées

M. LAROCHE, A. LACOURT

Avec la collaboration technique de Joëlle DAUPHANT

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, INRA Theix 63110 Beaumont

---

Résumé

Cette expérimentation avait pour but de préciser l'influence du pH, de la concentration en chlorure de sodium et de la température sur la couleur, la teneur en eau et la résistance à l'écrasement des fibres de protéines de tournesol.

Un essorage standard des mèches de fils a été obtenu à l'aide d'une centrifugation à 340 g pendant 3 min. Une relation a été mise en évidence, sauf après traitement thermique, entre la force obtenue à 50 p. 100 d'écrasement et le seuil de rupture avec un coefficient de corrélation égal à 0,91.

Les fibres protéiques ont une couleur beige clair à pH 1 et brunissent progressivement avec l'augmentation du pH. Faible aux pH inférieurs à 4 (de l'ordre de 45 p. 100,) la teneur en eau augmente avec le pH pour atteindre 75 p. 100 à pH 10,5). La résistance à l'écrasement est liée au pH et diminue avec l'alcalinisation des fibres. L'influence du pH est parfaitement réversible mais ceci n'est pas vrai pour l'action de la concentration en NaCl. Le coefficient de partage de l'ion Cl^- entre la solution et les mèches à l'équilibre indique une fixation faible mais irréversible des ions sur les fibres. Le salage a aussi une influence importante sur le pH des fibres. La teneur en eau du produit diminue avec l'augmentation de la concentration en sel, et cela surtout entre 0 et 2 p. 100 de sel dans les fibres. La résistance à l'écrasement augmente avec la concentration saline.

Les traitements thermiques ont une action complexe lorsque la température est supérieure à 40 °C. La teneur en eau et la couleur ne sont pas significativement différentes. La résistance à l'écrasement reste inchangée tant que l'on n'atteint pas le seuil de rupture. Celui-ci augmente avec la température et est multiplié par un facteur 1,7 après un chauffage à 90 °C.

Mots clés : *tournesol, protéines filées, comportement mécanique, influence de l'eau, chlorure de sodium, pH, traitement thermique.*

Introduction

De plus en plus, l'utilisation de protéines végétales texturées est envisagée dans l'alimentation humaine. Ces protéines peuvent avoir des origines différentes et être utilisées sous diverses formes (LEFEBVRE, 1970; LACOURT, 1973; CULIOLI, 1975). Les poudres et extrudats, protéines peu purifiées et donc peu coûteuses, sont incorporés dans les produits transformés, à des taux suffisamment bas pour n'être pas perçus par le consommateur. En diluant la viande, ils permettent d'abaisser le prix de revient et ils peuvent également intervenir au niveau des caractéristiques organoleptiques de ces produits en améliorant leur rétention d'eau à la cuisson et par conséquent leur jutosité (ANDERSON et LIND, 1975).

Dans un avenir proche, ces protéines pourront être le constituant essentiel d'aliments végétaux imitant la viande (AVIV) ou d'aliments nouveaux. Il est pour cela nécessaire de donner à ces aliments une structure leur conférant une texture satisfaisante. En vue d'imiter un produit fibreux tel que la viande, l'utilisation de protéines filées s'impose. Ce type de texturation nécessite des isolats d'une grande pureté et les fils obtenus doivent ensuite être assemblés afin d'imiter la structure du muscle. Certaines firmes américaines ont déjà élaboré de tels produits à partir de fibres de protéines de soja, mais leur mode de préparation est maintenu secret ou protégé par des brevets. De toutes façons cette technologie n'est pas directement appliquable à des isolats provenant de végétaux autres que le soja, et en particulier des graines de tournesol.

Les protéines texturées ne peuvent prétendre se substituer à leurs homologues naturels que dans la mesure où, pour un moindre coût, elles présentent des caractéristiques organoleptiques acceptables. Lorsque les protéines végétales sont utilisées en tant qu'additifs, leur manque de texture n'est pas fondamentalement gênant au niveau des caractéristiques du produit fini. Par contre, lorsqu'elles en représentent le constituant principal, leur comportement mécanique est très important dans la reconstitution d'une texture « viande ». Cette texture est la résultante des propriétés des fibres elles-mêmes et de celles des liants qui confèrent au produit la consistance, notamment au cours des manipulations et des préparations culinaires.

L'élaboration d'aliments végétaux imitant la viande nécessite des traitements successifs. Considérons par exemple le cas d' « analogues » de produits de charcuterie entrant dans la préparation de plats cuisinés : ils contiennent du sel, ils sont généralement consommés après cuisson et/ou réchauffage, ils sont en présence de légumes qui peuvent avoir des pH inférieurs à 4 comme dans la choucroute ou voisins de la neutralité comme dans les légumes après blanchiment alcalin. Tous ces facteurs peuvent modifier de façon importante les propriétés mécaniques des fibres. Il est donc nécessaire de connaître ces propriétés et les modifications qu'elles subissent au cours de la préparation des aliments.

Les méthodes instrumentales utilisées dans l'étude de la texture de la viande sont nombreuses (SZCZNIAK et TORGESON, 1965), mais leur usage dans le cas des protéines végétales filées est resté jusqu'à présent très limité (STANLEY *et al.*, 1972; AGUILERA *et al.*, 1975; MILLER et MORROW, 1975; LAROCHE et SALE, 1976; LAROCHE, 1977). Nous avons donc, au cours de ce travail, comparé le comportement mécanique de fibres de protéines de tournesol à celui de la viande. Notamment, nous avons étudié l'influence du pH, de la teneur en sel et de la température comme facteurs intervenant au cours de la fabrication de charcuterie ou de plats cuisinés.

I. — Matériels et méthodes

1.1. — *Matériel utilisé*

L'isolat a été préparé à partir de tourteaux de graines de tournesol par le Centre de Recherches Agro-Alimentaires de l'I.N.R.A. de Nantes (La Géraudière — 44300 Nantes) selon le brevet de PETIT *et al.* (1975).

Le filage a été effectué par la Société Rhône-Poulenc (Centre de Recherches des Carrières, 69190 St-Fons) à l'aide d'une tête de filière percée de 747 trous de 0,15 mm de diamètre (FABRE, 1975). A la sortie du banc de filage, les fils ont un diamètre approximatif de 0,1 mm et sont assemblés en un ruban de 7 à 10 mm de large et de 1 mm d'épaisseur.

Deux lots de fibres ont été utilisés dans nos expériences. Les fibres destinées à l'étude de la conservation et de l'hydratation ont été placées dans des sacs de polyéthylène scellés, maintenus à 0, + 2 °C et conservés ainsi jusqu'au moment de leur utilisation. Dans les autres essais, les fibres ont été congelées immédiatement après filage et décongelées à + 2 °C au fur et à mesure des besoins expérimentaux.

1.2. — *Préparation des échantillons*

Les mèches ont été placées dans une solution à un pH et à une concentration en sel déterminés pendant un temps suffisant pour atteindre l'équilibre. En fin d'incubation, elles ont été essorées de façon standard avant d'être soumises aux différentes mesures.

1.2.1. *Influence du pH*

Les fibres ont été immergées dans des solutions molaires de NaCl dans lesquelles on a ajouté progressivement, en 24 h, afin d'éviter de trop fortes variations locales de pH, des solutions d'acide chlorhydrique ou de soude en agitant modérément pour ne pas désorganiser les mèches. Du fait de la concentration initiale en chlorure de sodium, l'influence de l'addition des ions Cl^- et Na^+ a été négligeable.

Dans certains cas nous avons réajusté à pH alcalin des fibres qui avaient été au préalable équilibrées à un pH acide. Ceci nous a permis de vérifier la reversibilité de l'action du pH sur les protéines texturées.

1.2.2. *Concentration en chlorure de sodium*

L'influence du chlorure de sodium a été étudiée en immergeant les fibres dans des solutions à différentes concentrations dans lesquelles les fibres représentaient environ 15 p. 100 du volume total. Le temps d'immersion a été de 24 h. Le pH de la solution a été mesuré en fin d'incubation.

Comme précédemment des fibres préalablement salées ont été placées dans de l'eau distillée ou dans des solutions de force ionique faible pendant 24 h afin d'étudier la réversibilité des transformations induites par le chlorure de sodium.

1.2.3. *Influence de la température*

Afin de fixer au préalable les conditions de force ionique et de pH des protéines, les mèches ont été placées à + 2 °C, pendant 8 jours, dans une solution de chlorure de sodium molaire maintenue par addition de soude à pH 6,3. Après essorage les mèches ont été immergées pendant 10 minutes dans une solution de NaCl 50 mM et à pH 6,3, thermostatée à une température choisie pour l'essai et comprise entre 10 et 90 °C. Puis elles ont été essorées à nouveau et conservées à + 2 °C dans un sac plastique fermé pendant 24 h.

1.3. — *Mesures effectuées*

1.3.1. *Dosage des chlorures*

La concentration des ions Cl^- a été déterminée dans les fibres après essorage et dans la solution résiduelle à l'aide d'un Chlor-O-Counter. Cet appareil effectue un dosage coulométrique des ions chlores présents dans le milieu réactionnel jusqu'à leur précipitation totale sous forme de chlorure d'argent. L'erreur de dosage est inférieure à 2 p. 100.

1.3.2. *Humidité*

La teneur en eau de chaque échantillon a été déterminée en mesurant la matière sèche après étuvage à 105 °C pendant 48 h.

1.3.3. *Mesures de couleur*

La couleur des fibres à différents pH a été mesurée par réflectométrie. Les spectres de réflexion ont été relevés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DB équipé d'une sphère intégratrice. Les spectres ont été analysés selon le système Lab (Francis et Clydesdale, 1975).

1.3.4. *Mesures mécaniques*

Les propriétés mécaniques des fibres ont été étudiées à l'aide de tests de compression (Laroche et Sale, 1976). Les mesures ont été effectuées au cours de déformation par écrasement de l'échantillon jusqu'à une épaisseur résiduelle représentant 10 p. 100 de son épaisseur initiale. Les déformations ont été limitées à 50 p. 100 pour les échantillons les plus durs. En effet, dans ces cas extrêmes, la résistance mécanique du matériel de mesure, notamment des capteurs de force, ne permettait pas de procéder à des déformations supérieures.

II. — Résultats et discussion

2.1. — *Standardisation de l'état d'hydratation des mèches*

Les lots de mèches dont nous disposions étaient humides. Si l'état d'hydratation des protéines à l'intérieur des mèches pouvait être considéré comme homogène, il n'en était pas de même pour la quantité d'eau retenue à l'extérieur des

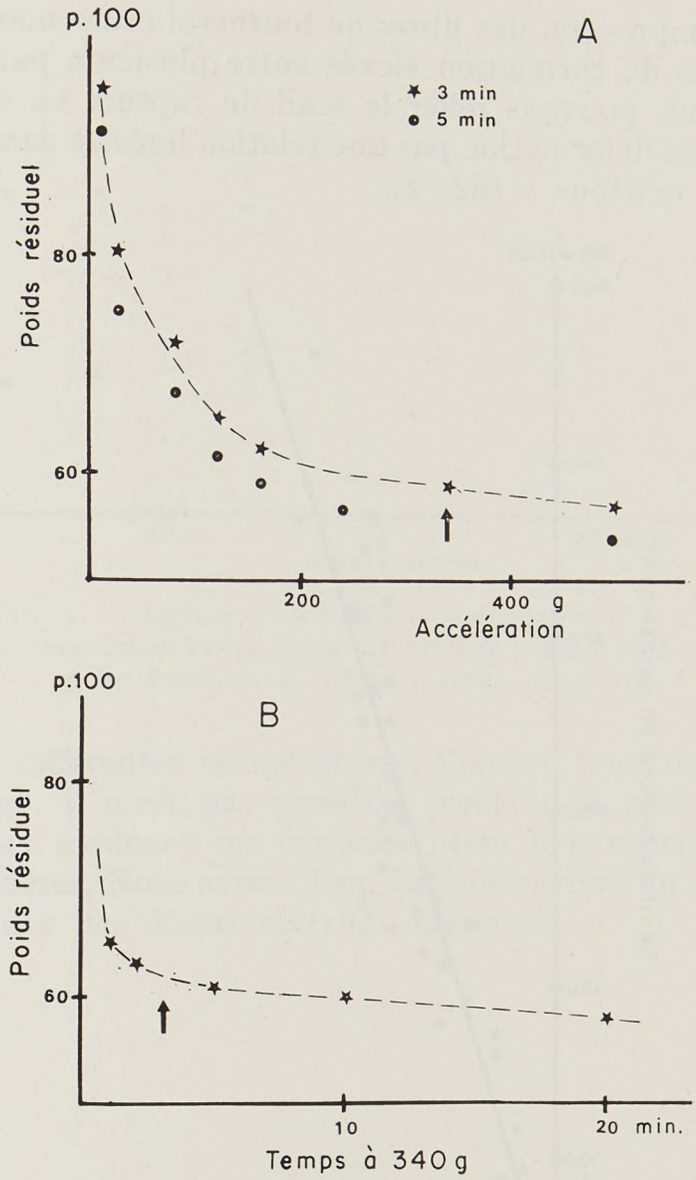


FIG. 1. — *Poids résiduel en p. 100 du poids initial, après centrifugation.*
A) Temps constant. B) Accélération constante.
Les flèches indiquent les conditions d'essorage standard.

fibres. La variation de cette quantité d'eau risquait de fausser les mesures de matière sèche et les dosages de chlorures. LAROCHE (1977) a montré que l'eau retenue entre les fibres a une influence non négligeable sur les mesures mécaniques obtenues par compressions.

Nous avons procédé à des essais préalables de centrifugation à l'aide d'une petite essoreuse dont la vitesse de rotation est régulée à l'aide d'un alternostat. En nous basant sur les résultats présentés dans la figure 1, nous avons défini des conditions standards d'essorage (340 g-3 mn) qui ont été appliquées à tous les lots étudiés dans nos essais. Dans ces conditions nous avons admis que la quantité d'eau « extérieure » aux fibres est identique pour tous les échantillons.

2.2. — *Caractérisation des paramètres mécaniques*

Les paramètres utilisés pour caractériser le comportement des protéines végétales filées ont été définis par LAROCHE et SALE (1976). De plus, LAROCHE (1977) a montré, dans le cas de protéines de soja filées, que ces paramètres sont bien reliés entre eux.

Les tests de compression des fibres de tournesol crues nous permettent d'obtenir des coefficients de corrélation élevés entre plusieurs paramètres.

Notamment nous pouvons relier le seuil de rupture en écrasement « S » à la force à 50 p. 100 de déformation par une relation linéaire dans laquelle les forces sont exprimées en newtons : (fig. 2).

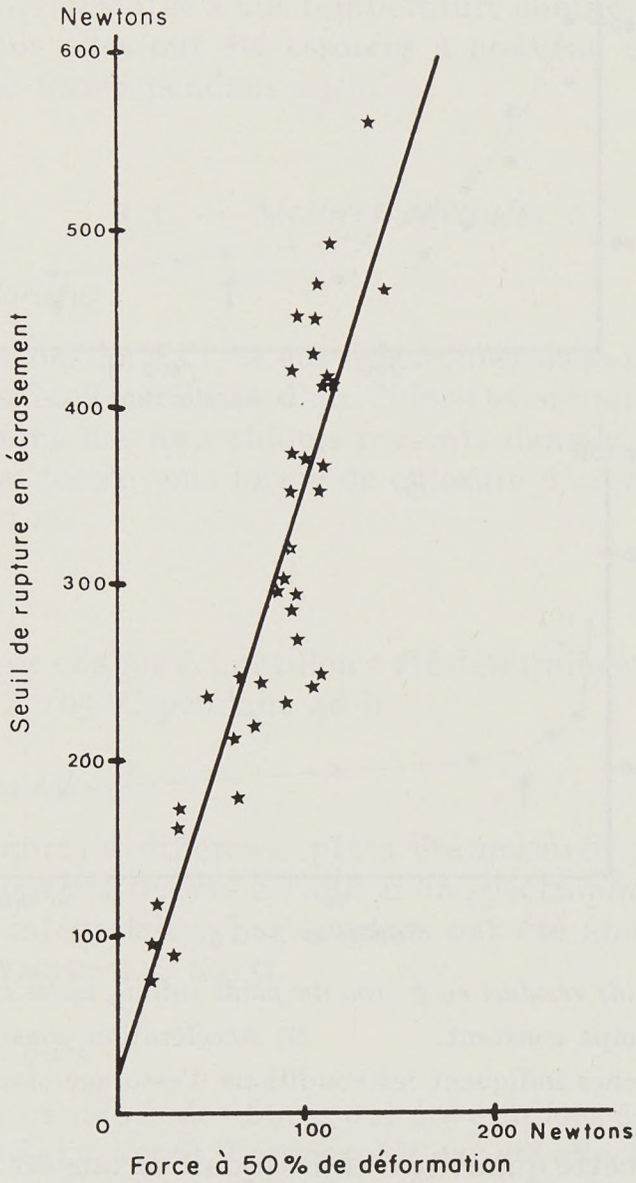


FIG. 2. — *Relation entre la valeur du seuil de rupture en écrasement et la force à 50 p. 100 de déformation.*

$S = 3{,}43\ F_{50} + 17{,}8$ avec un coefficient de corrélation $r = 0{,}91$. Cette relation nous permet d'utiliser indifféremment les paramètres obtenus dans les écrasements à 50 p. 100 ou dans ceux à 90 p. 100 de l'épaisseur initiale pour lesquels la déformation correspondant au seuil de rupture est dépassée.

Afin d'illustrer le comportement mécanique des fibres en fonction des facteurs qui leur sont appliqués, nous utiliserons soit le seuil de rupture en écrasement S lorsqu'il est disponible pour toutes les mesures, soit la force à 50 p. 100 de déformation dans les essais pour lesquels certains échantillons sont très résistants.

2.3. — *Comportement mécanique des fibres au cours de la conservation*

La figure 3 indique les résultats des mesures du seuil de rupture en écrasement pour des échantillons stockés sous vide à + 2 °C ou des échantillons gardés

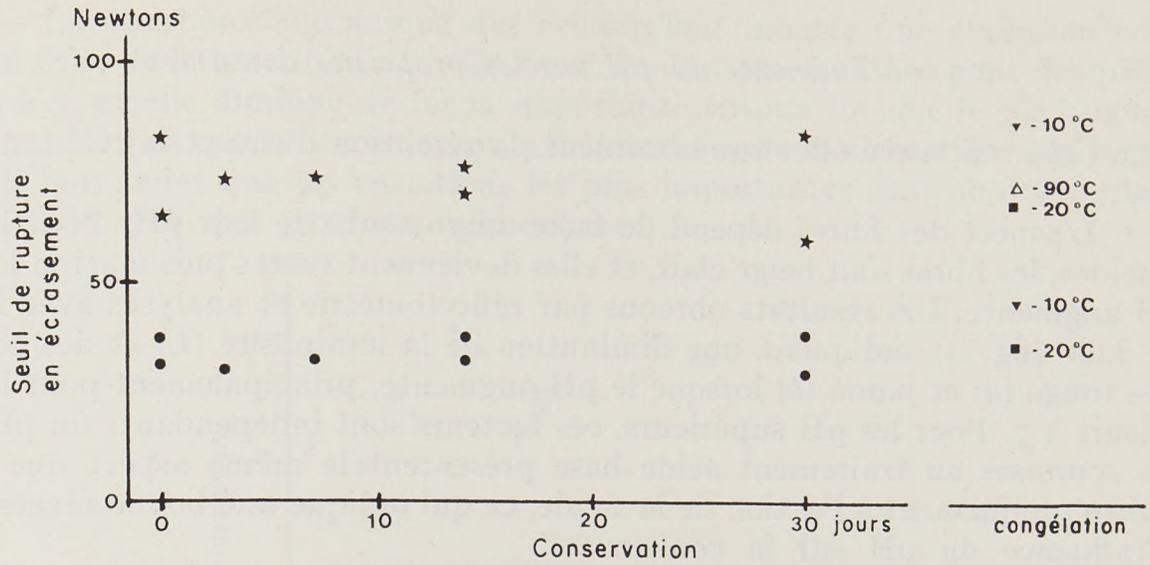


FIG. 3. — *Influence du temps de conservation à + 2 °C et de la congélation sur la valeur du seuil de rupture en écrasement pour deux lots de fibres (Cercles et étoiles).*

à l'état congelé à différentes températures. Compte tenu de l'hétérogénéité de la matière première, il n'est pas possible, pendant la période de conservation étudiée, de mettre en évidence une variation nette de la résistance pour aucun des lots de fibres considérés. Nous avons donc fait abstraction du stockage au cours de l'étude de l'influence des divers facteurs envisagés.

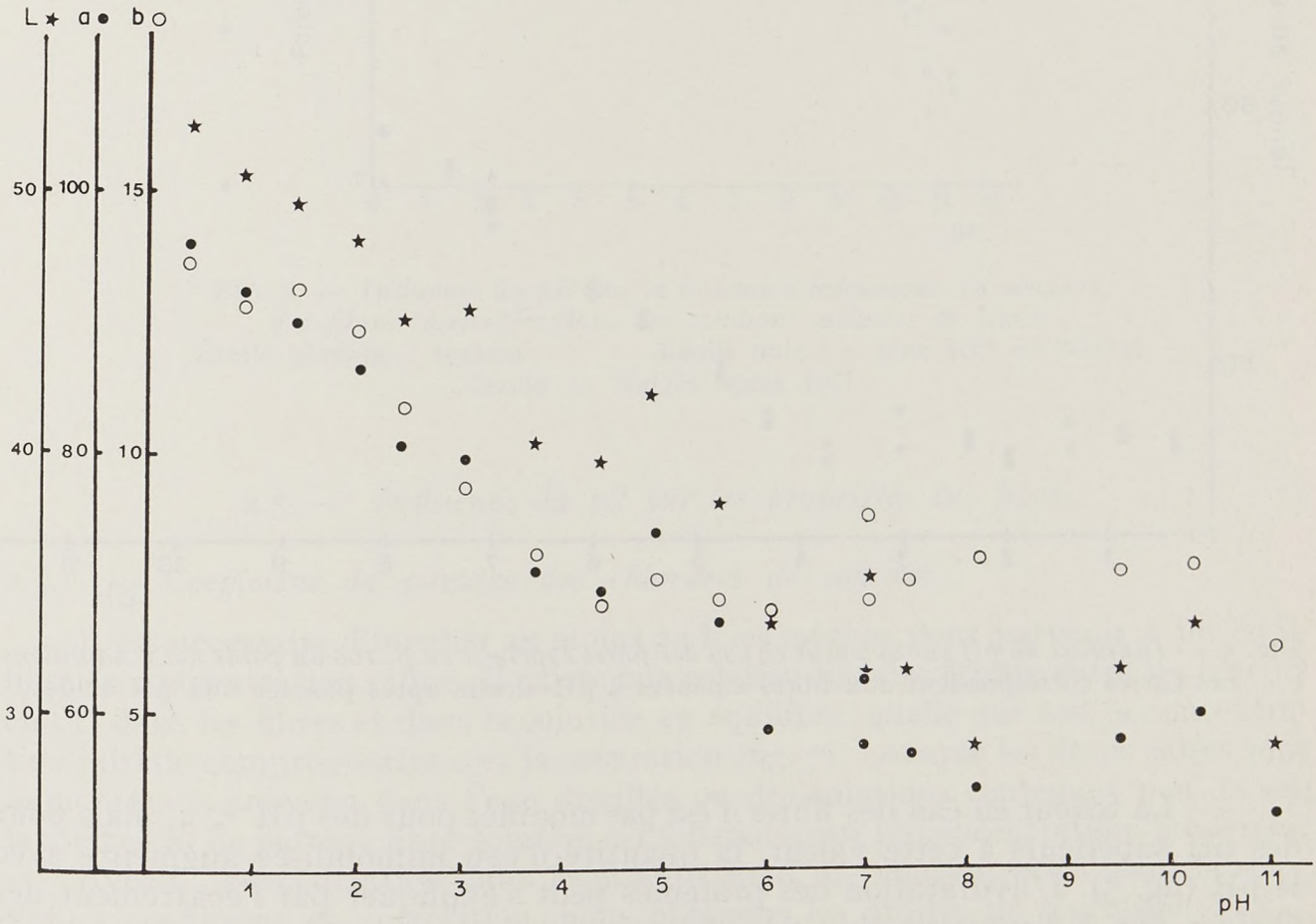


FIG. 4. — *Influence du pH sur la couleur des fibres.*
Étoiles = Luminosité L.
Cercles noirs = Composante rouge *a*
Cercles blancs = Composante jaune *b*.

2.4. — *Influence du pH sur les propriétés des fibres*

Le pH a un triple effet sur la couleur, la rétention d'eau et la résistance des fibres.

— L'aspect des fibres dépend de façon importante de leur pH. Pour les pH très acides, les fibres sont beige clair, et elles deviennent vertes puis marron lorsque le pH augmente. Les résultats obtenus par réflectométrie et analysés avec le système Lab (fig. 4) indiquent une diminution de la luminosité (L) et des composantes rouge (*a*) et jaune (*b*) lorsque le pH augmente, principalement pour les pH inférieurs à 7. Pour les pH supérieurs, ces facteurs sont indépendants du pH. Les fibres soumises au traitement acide base présentent le même aspect que celles soumises uniquement à l'action de la soude, ce qui indique une bonne réversibilité de l'influence du pH sur la couleur.

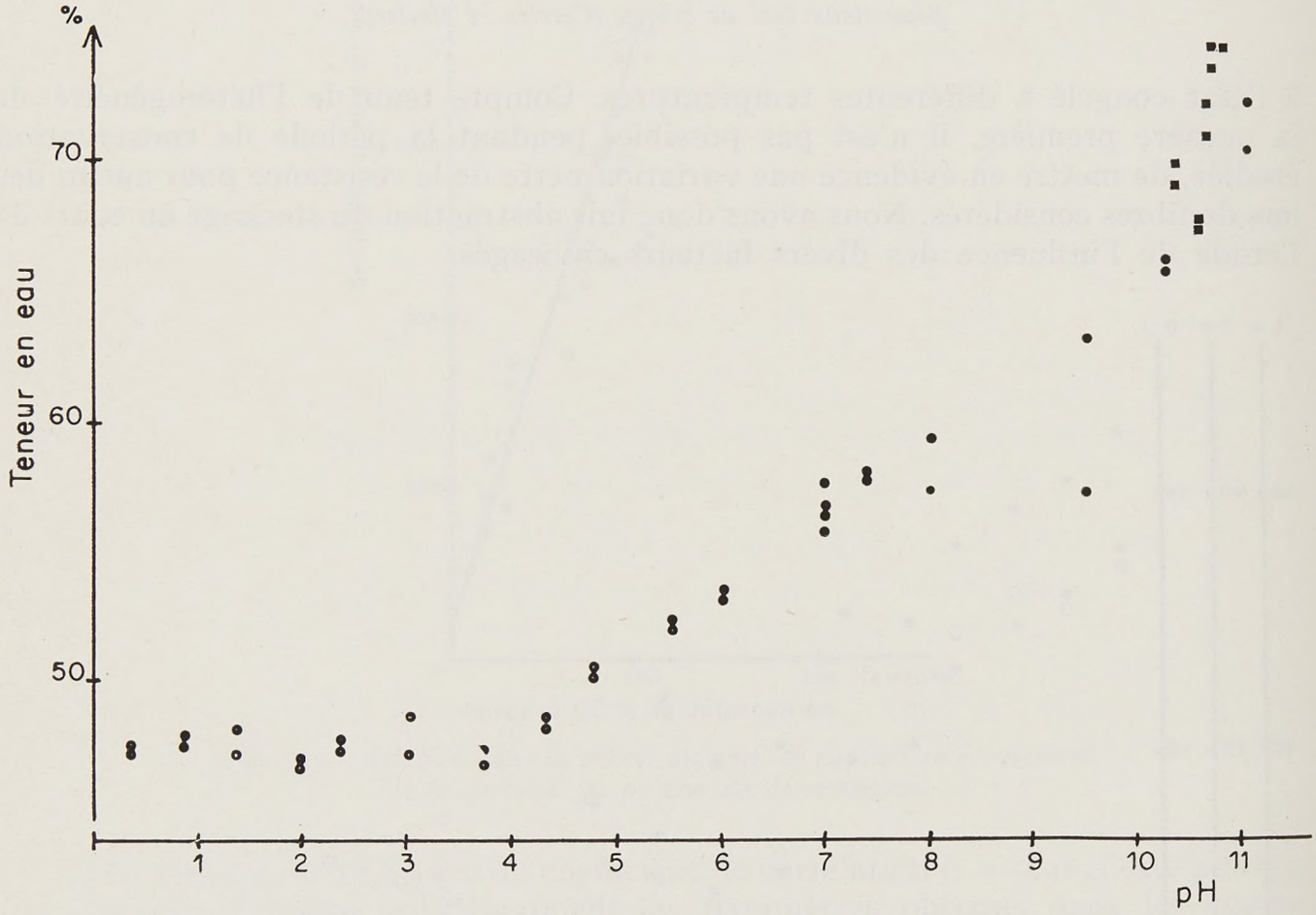


FIG. 5. — *Influence du pH sur la teneur en eau des fibres exprimée en p. 100 du poids des échantillons.* Les carrés correspondent aux fibres amenées à pH alcalin après passage aux pH acides.

— La teneur en eau des fibres n'est pas modifiée pour des pH < 4, mais pour des pH supérieurs à cette valeur, la quantité d'eau immobilisée augmente avec le pH (fig. 5). L'hydratation des protéines peut s'expliquer par l'écartement des chaînes due à l'augmentation des charges négatives. Les fibres amenées à pH basique après avoir été ajustées à pH acide ont donné des points qui sont trop regroupés dans la zone alcaline pour que l'on puisse apprécier la reversibilité de l'action du pH sur la teneur en eau.

— La résistance mécanique des échantillons montre une évolution comparable à celle de la teneur en eau (fig. 6). Elle n'est pas modifiée pour des pH inférieurs à 5, et elle diminue de façon importante ensuite lorsque le pH augmente. Il ne semble pas que la variation du pH introduise de modifications irréversibles, mais il faut noter que les variations les plus importantes sont observées dans la gamme de pH des produits alimentaires.

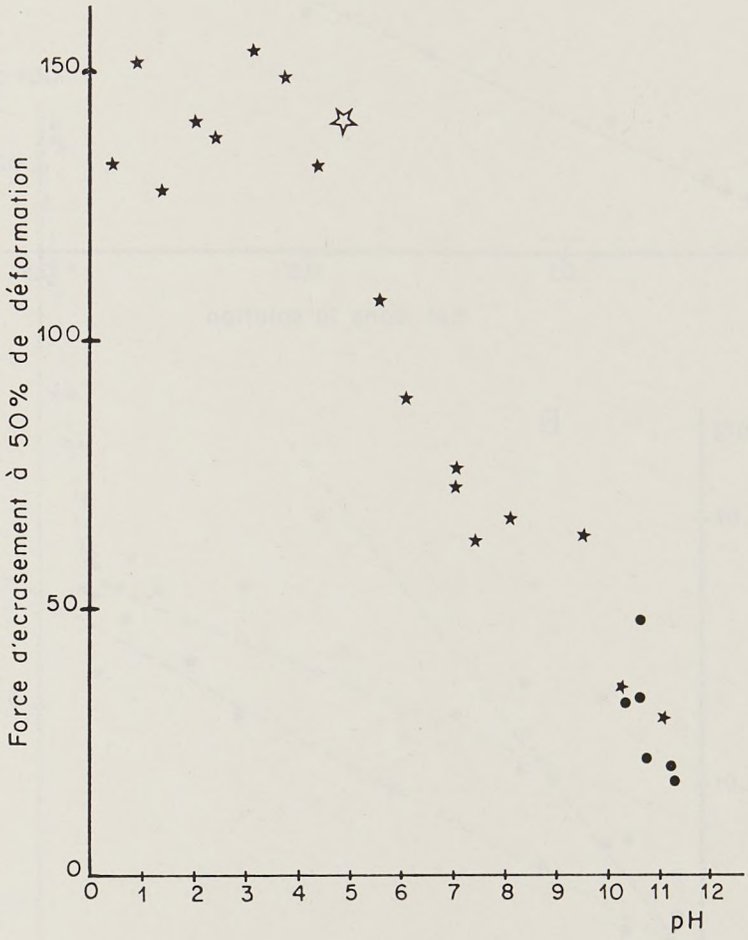


FIG. 6. — *Influence du pH sur la résistance mécanique, en newtons, des fibres immergées dans des solutions molaires de NaCl.*
Étoile blanche : témoin. Étoile noire = plus HCl ou NaOH
Cercle = NaOH après HCl.

2.5. — *Influence du sel sur les propriétés des fibres*

2.5.1. — *Coefficient de partage des chlorures de sodium*

Il est nécessaire d'incuber au moins 24 h les mèches pour parvenir à un équilibre en concentration saline. Il existe une relation linéaire étroite entre les teneurs en Cl^- dans les fibres et dans la solution en équilibre, quelle que soit la concentration initiale comprise entre 0 et la saturation (fig. 7). Lorsque les fibres salées sont immergées à nouveau dans l'eau distillée ou des solutions contenant peu de sel, le coefficient de partage fibre-solution est différent pour les concentrations modérées.

Avec C_F concentration dans le produit final, C_S concentration dans la solution, r coefficient de corrélation, nous obtenons les droites de régression :

— Salage : $C_F = 6{,}12 + 0{,}43\ C_S$ $r = 0{,}998$ 13 valeurs
— Rinçage : $C_F = 5{,}24 + 0{,}97\ C_S$ $r = 0{,}898$ 9 valeurs
($C_F < 50$ mg/g)

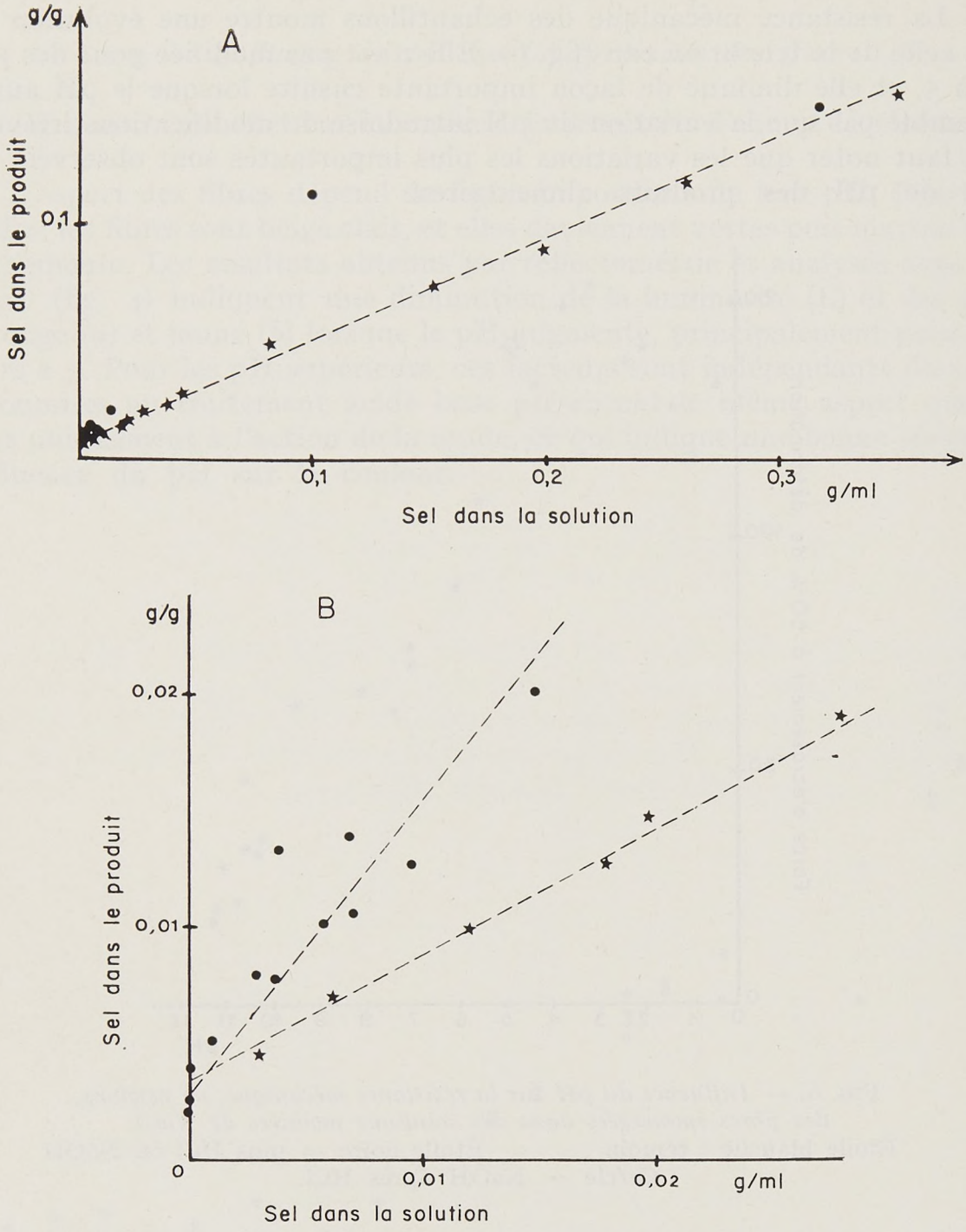


FIG. 7. — *Coefficient de partage du sel entre les fibres et la solution.*
Étoiles = salage. Cercles = rinçage. A = gamme totale de concentration.
B = faibles concentrations.

Dans les deux cas, la droite de régression ne passe pas par l'origine, ce qui montre une affinité entre les composants des fibres et les ions Cl^-. D'autre part, avec E teneur en eau des fibres salées, nous obtenons toujours $E \times C_S < C_F$. Une partie du sel contenue dans le produit est donc nécessairement fixée aux protéines.

Pour le rinçage, nous avons considéré uniquement les faibles concentrations salines, pour lesquelles nous disposions de suffisamment de points. Il est évident que la courbe doit rejoindre celle obtenue pour le salage pour des concentrations proches de la saturation, mais nous ne disposons pas de suffisamment de points pour la tracer.

La différence entre les deux coefficients de partage, dans la zone où il nous est possible de les comparer, nous indique que la liaison entre le sel et les protéines est relativement forte, qu'il faut une forte élution pour que le sel soit libéré et qu'une partie même semble fixée de façon irréversible. En effet, pour certains échantillons rincés des chlorures ont été dosés dans les fibres alors qu'ils ne l'étaient pas dans la solution.

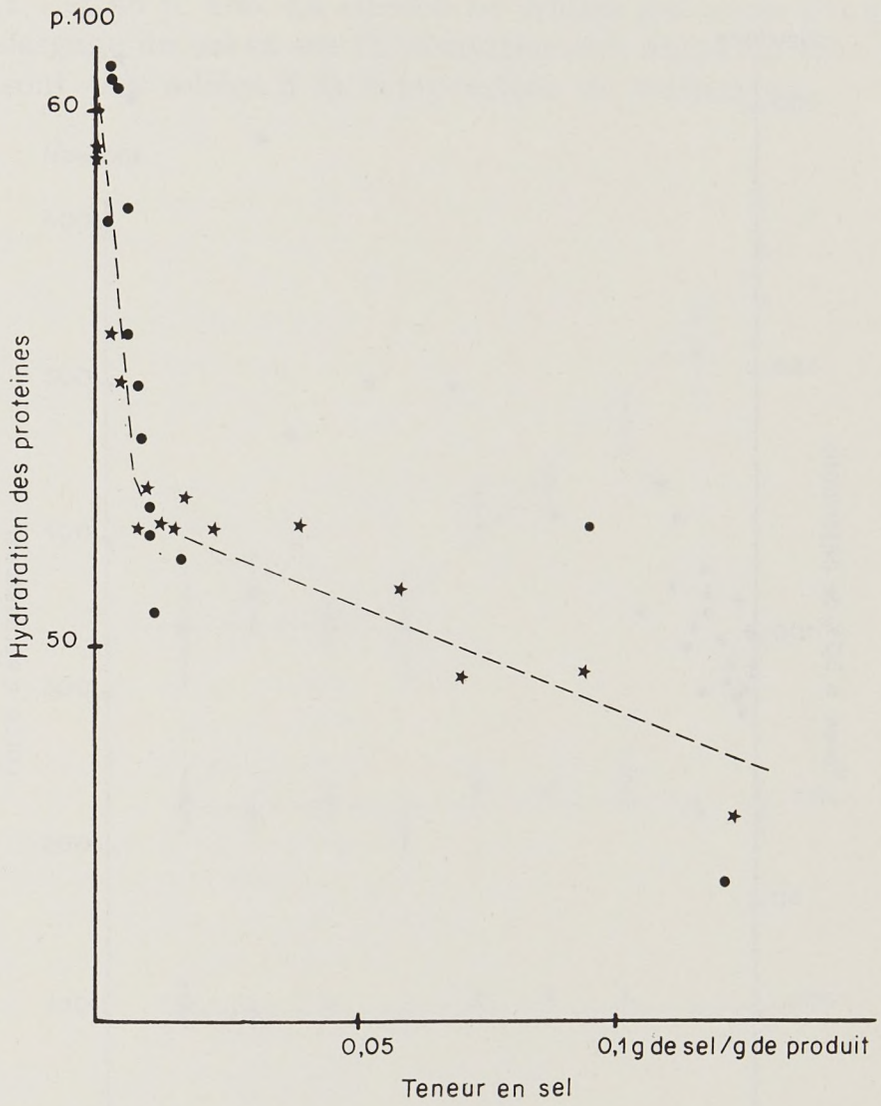


FIG. 8. — *Influence de la teneur en sel sur l'hydratation des protéines, en p. 100 du poids de l'échantillon salé.*

Étoiles = salage. Cercles = rinçage.

2.5.2. — *Influence des concentrations salines sur le pH*

Le salage et le rinçage ont une action non négligeable sur le pH des fibres. Le pH de la solution en équilibre avec les fibres est de 4,92 ± 0,15 dans le cas du salage et de 5,90 ± 0,60 après rinçage. Ceci correspond à une différence hautement significative, dans une zone de pH ou la résistance des fibres dépend beaucoup de ce facteur. Nous n'avons pas pu expliquer cette différence de l'ordre d'une unité pH.

2.5.3. *Action du sel sur les propriétés des fibres*

La teneur en eau du produit diminue lorsque la concentration en sel augmente (fig. 8). Cette diminution est surtout importante pour les concentrations en sels comprises entre 0 et 2 p. 100 dans les fibres.

Les points obtenus après rinçage sont très dispersés, mais il semble que pour une teneur en sel identique, leur teneur en eau soit supérieure à celle des fibres uniquement salées.

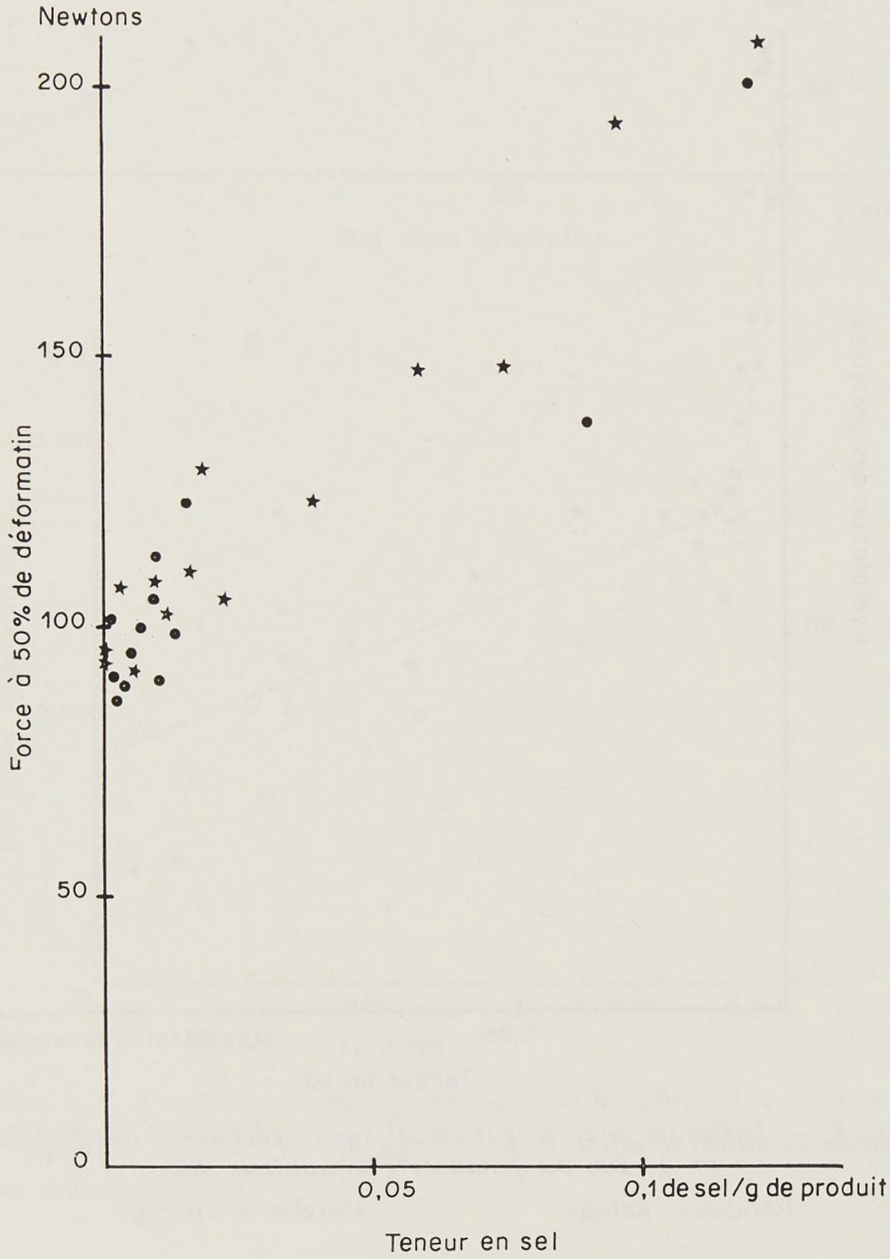


FIG. 9. — *Influence de la teneur en sel sur la résistance des fibres.*
Étoiles = salage. Cercles = rinçage.

La force d'écrasement à 50 p. 100 de déformation augmente lorsque la teneur en sel augmente (fig. 9). Les valeurs obtenues après rinçage sont comparables à celles obtenues par salage. Mais après rinçage les fibres sont à un pH moyen égal à 5,9 au lieu de 4,92. Elles devraient donc présenter des résistances beaucoup plus faibles. Nous pouvons donc penser que la différence de résistance due à la variation de pH est masquée par des transformations irréversibles intervenues dans la structure des fibres sous l'effet du sel.

2.6. — *Influence de la température sur les propriétés des fibres*

Les fibres de protéines de tournesol en équilibre avec une solution molaire de chlorure de sodium ajustée à pH 6,3 sont incubées à la température choisie pendant 10 min. dans de l'eau contenant 50 mM de NaCl /l. Après essorage chaque lot contient une quantité de chlore comprise entre 1,8 mg par g pour la plus faible et 3,5 mg /g pour la plus forte. La teneur en eau est comprise entre les valeurs extrêmes de 51,2 et 56 p. 100. La cuisson ne semble pas avoir d'influence importante sur le relargage du sel et sur l'hydratation des fibres, en effet les variations observées ne sont pas reliées à la température de traitement.

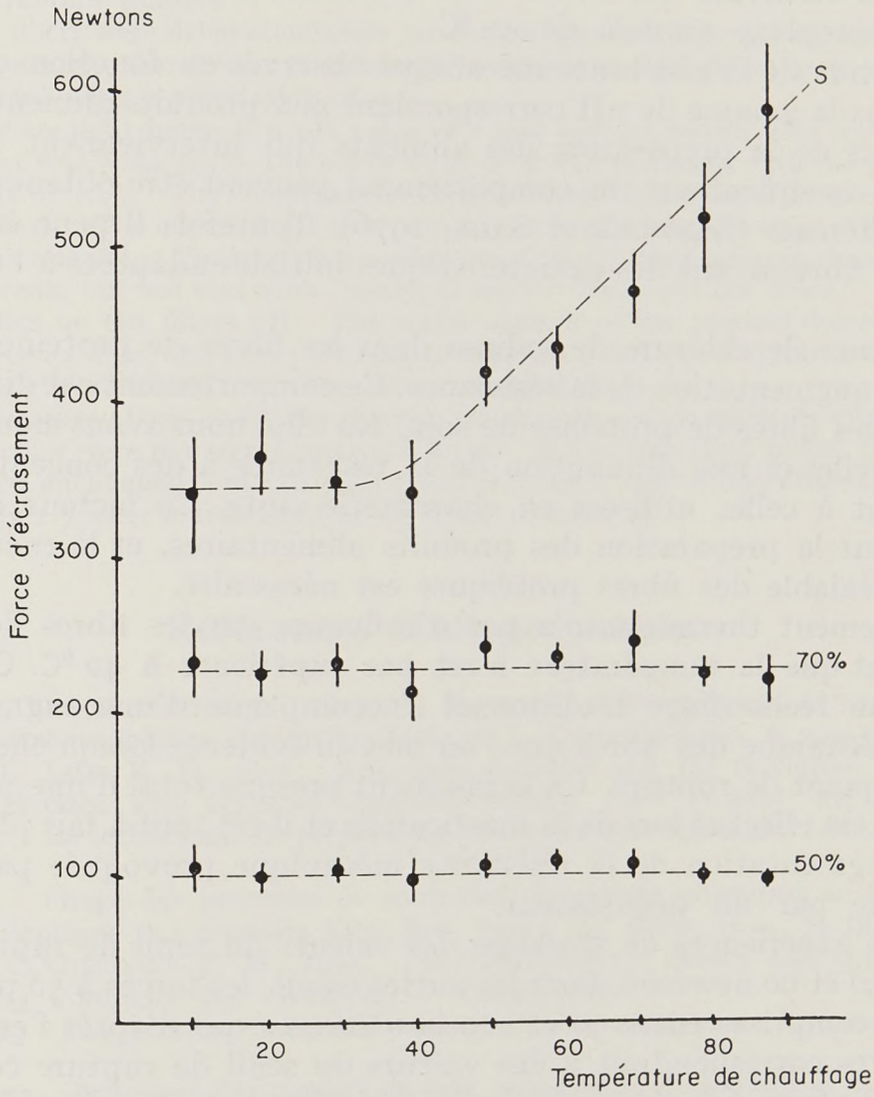


FIG. 10. — *Influence de la température de chauffage sur la résistance des fibres. Chaque point est représenté avec plus ou moins un écart-type.*

La température n'a pas d'influence sur les forces d'écrasement à 50 p. 100 et 70 p. 100 de déformation, mais on observe une augmentation de la valeur du seuil de rupture « S » après chauffage à des températures supérieures à 40 °C (fig. 10). Ainsi l'action du traitement thermique n'est significative que lorsque l'écrasement est suffisamment important pour provoquer la rupture des fibres. La corrélation qui existe entre les forces à différents taux de déformation et le seuil de rupture n'est plus valable lorsque les mèches de protéines de tournesol filées ont subi un chauffage à une température supérieure à 40 °C.

L'augmentation de la résistance des fibres provoquée par les traitements thermiques n'est révélée que par un écrasement maximum. La force de rupture est pratiquement doublée lorsque les mèches subissent un chauffage de 10 min. à 90 °C.

Conclusion

La teneur en sel et le pH ont une influence importante sur les propriétés des fibres de tournesol filées. Notamment le sel amène des transformations irréversibles dans la structure des fibres. Les traitements thermiques ont une action durcissante complexe au-delà de 40 °C.

La variation de la résistance mécanique observée en fonction du pH, principalement dans la gamme de pH correspondant aux produits alimentaires doit être considérée lors de la préparation des aliments qui interviennent dans les plats cuisinés. Des modifications du comportement peuvent être obtenues en utilisant des liants différents (LAROCHE et SALE, 1976). Toutefois il peut être intéressant d'utiliser des fibres ayant des caractéristiques initiales adaptées à l'usage envisagé de l'aliment.

La présence de chlorure de sodium dans les fibres de protéines de tournesol entraîne une augmentation de la résistance. Ce comportement est différent de celui observé sur des fibres de protéines de soja. En effet nous avons montré (LAROCHE, 1977) pour celles-ci une diminution de la résistance à des concentrations salines correspondant à celles utilisées en charcuterie cuite. Ce facteur doit donc être considéré pour la préparation des produits alimentaires, et là encore une caractérisation préalable des fibres protéiques est nécessaire.

Le traitement thermique n'a pas d'influence sur les fibres de protéines de tournesol tant que la température n'est pas supérieure à 40 °C. Cependant une cuisson ou un réchauffage traditionnel s'accompagne d'une augmentation de la résistance mécanique des fibres que l'on met en évidence lorsqu'elles sont écrasées jusqu'à leur point de rupture. Un écrasement presque total d'une partie au moins des aliments est effectué lors de la mastication et il est tout à fait plausible de prévoir que l'augmentation de la résistance mécanique provoquée par le chauffage soit décelable par un dégustateur.

Dans les expériences de stockage, les valeurs du seuil de rupture sont comprises entre 30 et 90 newtons. Pour les autres essais, les forces à 50 p. 100 de déformation sont comprises entre 90 et 120 newtons, ce qui d'après l'équation reliant ces paramètres correspondrait à des valeurs du seuil de rupture comprises entre 300 et 400 newtons. Ces deux séries d'expériences ont été effectuées sur des lots de fibres différents. Les méthodes d'extraction et de mesures étant les mêmes, nous pouvons penser que les différences observées ont pour origine les conditions de filage sur lesquelles nous ne disposons pas de données précises. Il s'avère que la connaissance et la maîtrise des conditions de filage est nécessaire à une étude rhéologique et à l'utilisation ultérieure des fibres protéiques.

Après une cuisson de 4 h à l'ébullition, le muscle *Pectoralis profundus* présente en écrasement des valeurs du seuil de rupture comprises entre 60 et 180 newtons suivant que la viande est tendre ou dure. Si nous considérons les facteurs de transformation que nous avons étudiés, seules les fibres amenées à des pH supérieurs à 10 présentent une résistance acceptable pour le consommateur. Il semble donc que les protéines de tournesol texturées par filage dans les conditions actuelles

soient assez mal adaptées à une utilisation comme substitut de la viande au niveau des produits carnés et des plats cuisinés.

Reçu pour publication en juin 1978.

Summary

Effect of NaCl, pH and temperature on some properties of spun sunflower proteins.

This experiment was undertaken to investigate the effects of pH, sodium chloride concentration and temperature on the color, the moisture and the compression strength of fibers spun from sunflower protein isolates.

The bits of fibers were dried standardly by centrifugation at 340 g for 3 minutes. Except after thermal treatment, there was a relationship between the strenght at 50 p. 100 compression and the yield point with a correlation of 0.91.

The fibers were light beige at a pH value of 1 and became brown with an increase in pH. The water content was weak (45 p. 100 below a pH of 4) and increased with the pH, rising up to 75 p. 100 at a pH of 10.5. The compression strength varied with the pH, it decreased with the alkalization of fibers. The effect of pH was perfectly reversible but the effect of NaCl concentration on the fibers was not. The partition coefficient of the Cl^- ions between the solution and the bits indicates a weak, but not reversible linking of the Cl^- ions onto the fibers. The salting has an important effect on the fibers pH. The water content of the product decreased with an increase in salt concentration, and that particularly between 0 and 2 p. 100 salt in the fibers. The compression strength increased with the salt concentration.

For a temperature above 40 °C, the thermic treatments had an intricate effect. The water content and the color were not significantly different. Below the yield point, the compression strength remained unchanged, but the yield point increased with temperature above 40 °C. It was multiplied by 1.7 after a treatment at 90 °C for 10 minutes.

Références bibliographiques

AGUILERA J. M., KOSIKOWSKI F. V., HOOD L. F., 1975. Ultrastructure of soy protein fibers fractured by various texture measuring devices. *J. Texture Studies*, **6**, 549-554.

ANDERSON R. H., LIND K. D., 1975. Retention of water and fat in cooked patties of beef and of beef extended with textured vegetable protein. *Food Technol.*, **29**, 44-45.

CULIOLI J., 1975. La technologie de préparation des protéines végétales. *Ind. Aliment. Anim.*, **3**, 37-49.

FABRE M., 1975. Filage des protéines de tournesol. Propriétés physiques en relation avec la qualité organoleptique des produits filés. *Rev. Franç. des Corps Gras*, **11-12**, 593-598.

FRANCIS F. J., CLYDESDALE F. M., 1975. Food colorimetry: theory and applications. The AVI Publishing Company Inc. Wesport — Connecticut.

LACOURT A., 1973. Soy proteins in french products with a meat base. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**.

LAROCHE M., 1977. Influence des teneurs en eau, en chlorure de sodium et de calcium sur le comportement mécanique de protéines de soja filées. *Ann. Technol. Agric.*, **26** (3) *305-315*.

LAROCHE M., SALE P., 1976. Quelques aspects du comportement mécanique de protéines de tournesol filées. Influence de divers adjuvants et liants simples. *Ann. Technol. Agric.*, **25** (2), 143-158.

LEFEBVRE J., 1970. La production d'aliments texturés destinés à l'alimentation humaine à partir de protéines végétales. *Cah. Nut. Diet.*, **5** (4), 45-55.

MILLER W. M., MORROW C. T., 1975. Mechanical characterization of fibrous materials as related to meat analogs. *J. Text. Studies*, **6**, 473-487.

PETIT L., DAVIN A., GUEGUEN J., 1975. Procédé pour l'obtention d'isolats purifiés de protéines. Brevet Français n° 441 992.

STANLEY D. W., CUMMING D. B., DE MAN J. M., 1972. Texture structure relationships in texturized soy protein. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **5**, 118.

SZCZESNIAK A. S., TORGESON K. W., 1965. Methods of meat texture measurement viewed from the background of factors affecting tenderness, *Ad. Food Res.*, **14**, 33-165.

13

Ann. Technol. agric., 1978, 27 (4), 783-797.

Détermination des caractéristiques viscoélastiques du riz cuit à l'aide du viscoélastographe

B. LAIGNELET et R. ALARY

Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz,
Centre de Recherches Agronomiques de Montpellier, I.N.R.A.,
9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex, France

Résumé

Une nouvelle méthode de détermination des caractéristiques viscoélastiques du riz cuit est présentée. Elle est basée sur la mesure, à l'aide du viscoélastographe, de la fermeté et de la recouvrance élastique de grains de riz prélevés à différents temps de cuisson. L'influence de la durée de la cuisson, de la variété de riz étudiée, du degré d'usinage et du degré d'étuvage sur la fermeté et la recouvrance élastique des grains de riz est précisée.

Mots clés : *riz cuit, fermeté, recouvrance élastique, mesure, viscoélastographe.*

I. — Introduction

Les bases du jugement porté sur la qualité culinaire d'un échantillon de riz sont variables; elles sont en effet fonction de l'origine des populations interrogées et des modes de préparation. Ainsi les consommateurs occidentaux et les Chinois désirent des riz dont les grains demeurent bien individualisés, fermes et entiers après cuisson, même lorsqu'ils ont absorbé une importante quantité d'eau; à l'opposé, les Japonais préfèrent des produits pris en masse et collants. Dans tous les cas, la texture du riz est un élément majeur de son acceptabilité (SZCZESNIAK, 1971).

Il est possible de déterminer objectivement certaines des caractéristiques du riz cuit. La mesure de l'absorption d'eau ou des pertes au cours de la cuisson ne pose pas de problèmes particuliers. L'appréciation de la texture du riz cuit est plus délicate. Plusieurs solutions ont été proposées : mesure de la viscosité des grains de riz cuits et réduits en bouillie par HAMPEL (1965), mesure de la force nécessaire à l'extrusion du riz cuit à travers une filière (FEILLET et ALARY, 1975) ou à travers des fentes parallèles (*Kramer Shear Press*) (LISCH et LAUNAY, 1975), mesure de l'adhésion (TANAKA, 1975; MANOHAR KUMAR *et al.*, 1976), de la cohé-

sion (MANOHAR KUMAR *et al.*, 1976) et de la compressibilité (LISCH et LAUNAY, 1975; SUZUKI *et al.*, 1976).

Le viscoélastographe, mis au point dans notre laboratoire, permet d'évaluer les caractéristiques viscoélastiques des produits alimentaires en traçant des courbes de déformation en fonction du temps sous une force constante (courbe de retard), puis après suppression de la force (recouvrance) (FEILLET *et al.*, 1977). Tirant profit des informations que pouvait fournir ce nouvel appareil, nous avons mis au point une méthode d'appréciation objective de la texture du riz cuit. La répétabilité de la méthode et son aptitude à apprécier l'influence de la variété ou de traitements technologiques (degré d'usinage et degré d'étuvage) sur la texture du riz cuit ont été étudiées.

II — Matériel et méthodes

Échantillons de riz

Nous avons utilisé dix variétés de riz à grains longs, moyens ou courts cultivées en 1976 à la rizière expérimentale de l'*I.N.R.A.* au Mas d'Adrien : « Arlésienne » (moyen), « Balilla 28 » (court), « Césariot » (long), « Césariot β θ » (long), « Cigalon » (court), « Cristal » (court), « Delta » (long), « Euribé » (moyen), « 77-1 » (long), « 77-2 » (court).

Après récolte, les riz paddy ont été conservés dans une salle conditionnée à une température de 16-18 °C et à une humidité relative de 72-75 p. 100 de manière à ce que leur teneur en eau se stabilise vers 15 p. 100 matière humide (MH) au bout de 3 semaines (FEILLET et REDON, 1971).

Usinage

Soixante-dix grammes de riz sont décortiqués dans un appareil à rouleaux *Sataké* puis blanchis à l'aide d'une microrizerie à cône *Universale* dans les conditions décrites par FEILLET et REDON (1971). Après usinage, les grains entiers sont séparés des brisures par triage manuel. On appelle degré d'usinage le rapport entre le poids de riz entier blanchi et le poids de riz paddy décortiqué (riz cargo).

Étuvage

Nous avons utilisé l'appareil décrit par FEILLET et ALARY (1975) : le riz paddy est placé dans la chambre de traitement; après avoir appliqué un vide de 1 bar pendant 10 min, le riz est maintenu dans de l'eau à 65 °C sous une pression de 3,1 bar pendant 30 min, puis étuvé à 112 °C pendant 10, 20 ou 30 min. Après étuvage, le riz est séché dans des conditions identiques à celles utilisées pour le séchage du riz paddy après la récolte.

Appréciation des caractéristiques viscoélastiques du riz cuit

Un gramme et demi de riz entier est jeté dans 250 ml d'eau désionisée bouillante. Une fois atteint le temps de cuisson désiré, le riz est égoutté, ressuyé sur un tissu absorbant et placé dans une boîte de pétri saturée en vapeur d'eau (fig. 1), en prenant soin de bien séparer les grains les uns des autres.

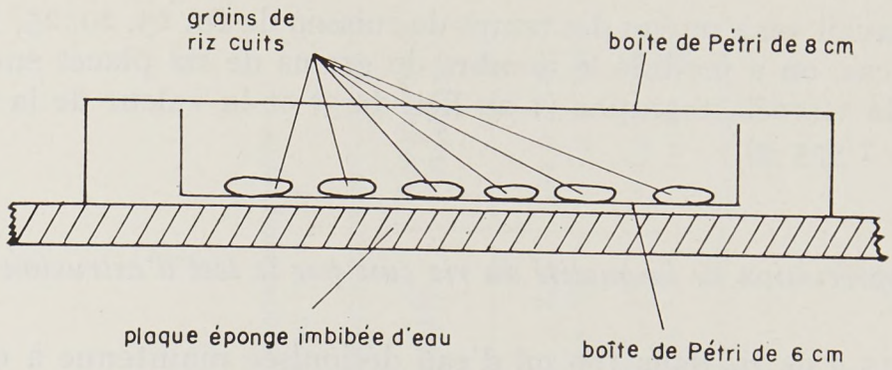


FIG. 1. — *Stockage des grains de riz cuit avant analyse.*
(Durée de stockage : 1 heure)

Une heure après la fin de la cuisson, on place 3 grains de riz sur le porte-échantillon du viscoélastographe préalablement réglé de la manière suivante : force : 700 g; durée d'application de la force : 40 s; durée du rebondissement : 20 s. Sur le viscoélastogramme obtenu (fig. 2), on mesure l'épaisseur (mm) du riz cuit avant l'application de la force (E), après écrasement (e_1) et après rebondissement (e_2).

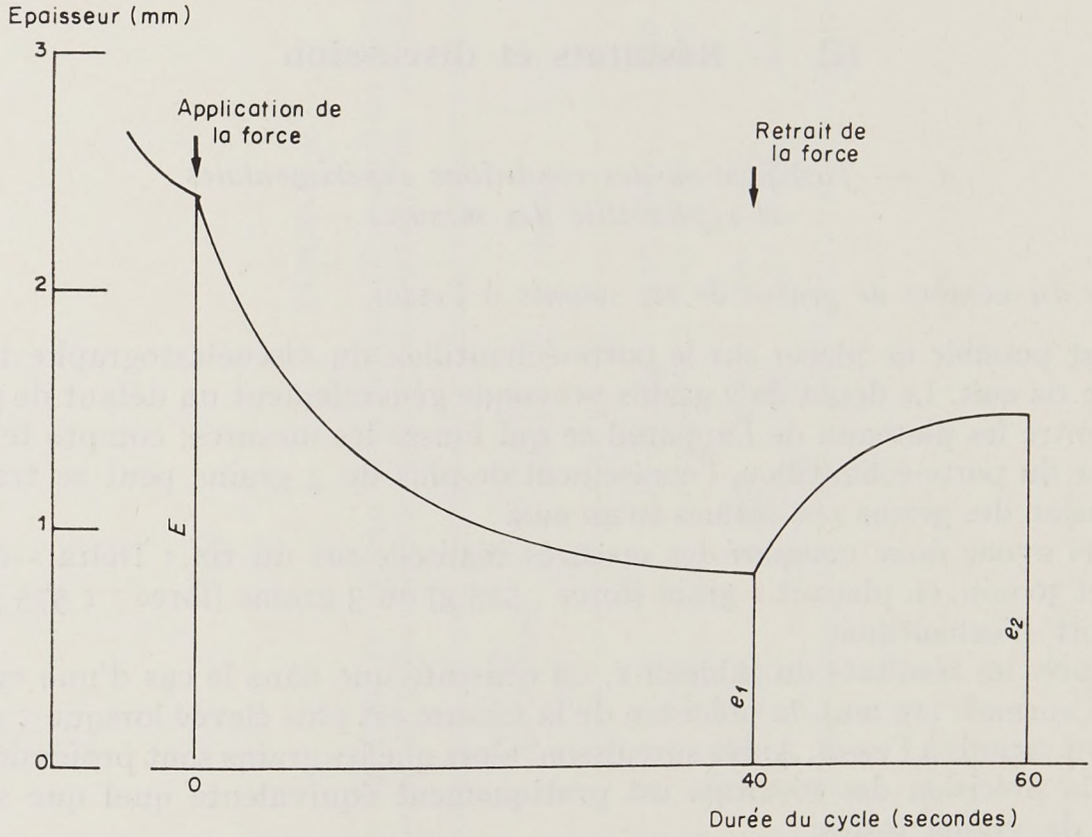


FIG. 2. — *Exemple de viscoélastogramme, E est l'épaisseur initiale du riz avant application de la force,* e_1 *l'épaisseur après écrasement,* e_2 *l'épaisseur après recouvrance.*

Cette mesure est répétée six fois. Pour chaque temps de cuisson, on déduit les caractéristiques du riz cuit suivantes :

— le gonflement $G = \overline{E}$,

— la fermeté $F = 100\ (\overline{e_1/E})$,

— la recouvrance élastique $RE = 100\ (\overline{(e_2 - e_1)/(E - e_1)})$.

Dans ce travail, on a retenu des temps de cuisson de 10, 15, 20, 25, 30 et 35 min. Dans certains cas, on a modifié le nombre de grains de riz placés sur le support d'échantillon du viscoélastographe (1 au lieu de 3) et la valeur de la force appliquée (525 g à 1 575 g).

Appréciation de la qualité du riz cuit par le test d'extrusion

On verse 15 g de riz dans 100 ml d'eau désionisée maintenue à 98 °C. Après cuisson, le riz est rapidement lavé sous l'eau courante pendant 30 s, puis égoutté pendant 5 min. On mesure alors la masse du riz cuit dont on déduit la quantité d'eau (g) fixée par 100 g de riz cru durant la cuisson (absorption d'eau).

On détermine ensuite, pour 2 temps de cuisson différents encadrant le mieux possible la valeur de 200 p. 100 d'absorption d'eau, la fermeté du riz cuit assimilée à la force (kg) nécessaire à l'extrusion du produit à travers une filière de forme géométrique définie. On appelle C_{200} la fermeté (calculée par interpolation linéaire) correspondant à une absorption d'eau égale à 200 (FEILLET et ALARY, 1975; ALARY *et al.*, 1977).

III — Résultats et discussion

1. — *Justification des conditions expérimentales et répétabilité des mesures*

a) *Choix du nombre de grains de riz soumis à l'essai*

Il est possible de placer sur le porte-échantillon du viscoélastographe 1 ou 3 grains de riz cuit. Le dépôt de 2 grains provoque généralement un défaut de parallélisme entre les plateaux de l'appareil ce qui fausse les mesures; compte tenu de la surface du porte-échantillon, l'écrasement de plus de 3 grains peut se traduire par la fusion des grains peu fermes entre eux.

Nous avons donc comparé les mesures réalisées sur du riz « Delta » étuvé, cuit 15 et 30 min, en plaçant 1 grain (force : 525 g) ou 3 grains (force : 1 575 g) sur le support d'échantillon

D'après les résultats du tableau 1, on constate que dans le cas d'une cuisson de durée normale (15 mn), la précision de la mesure est plus élevée lorsque 3 grains de riz sont soumis à l'essai. Après surcuisson, alors que les grains sont profondément altérés, la précision des résultats est pratiquement équivalente quel que soit le nombre de grains testés.

L'amélioration de la précision de la mesure due à une augmentation du nombre de grains a vraisemblablement pour origine une diminution de l'influence de l'hétérogénéité individuelle des grains.

Dans la suite de ce travail, toutes les analyses ont été faites sur 3 grains.

b) *Choix de la force*

Deux échantillons de riz de caractéristiques culinaires très différentes, l'un de « Delta » blanchi, l'autre de « Delta » étuvé ont été cuits 15 et 30 min puis analysés de manière à comparer l'influence de l'intensité de la force exercée (700 g

TABLEAU I

Valeurs moyennes et intervalles de confiance de la moyenne ($P = 0,05$) des caractéristiques de riz cuits mesurées au viscoélastographe : influence du nombre de grains déposés sur le porte-échantillon du viscoélastographe. Nombre de répétitions n = *12*

Force	Nombre de grains de riz	Temps de cuisson (mn)	Gonflement (mm)	e_1 (mm)	e_2 (mm)	$e_2 - e_1$ (mm)	Fermeté	Recouvrance élastique
525 g	1	15	2,42 ± 0,05	0,76 ± 0,19	0,98 ± 0,28	0,22 ± 0,09	31,5 ± 8,3	14,9 ± 8,7
		30	2,71 ± 0,11	0,43 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,05 ± 0,02	16,0 ± 1,6	2,4 ± 0,9
1 575 g . . .	3	15	2,57 ± 0,05	0,79 ± 0,07	1,11 ± 0,11	0,32 ± 0,05	30,8 ± 2,5	18,3 ± 3,7
		30	2,95 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,60 ± 0,06	0,09 ± 0,03	17,4 ± 1,1	3,4 ± 1,4

TABLEAU 2

Valeurs moyennes et intervalles de confiance de la moyenne ($P = 0,05$) des caractéristiques de riz cuits mesurées au viscoélastographe : influence de la force exercée. Nombre de répétitions $n = 12$

Sorte de riz	Force	Temps de cuisson (mm)	Gonflement (mm)	e_1 (mm)	e_2 (mm)	$e_2 - e_1$ (mm)	Fermeté	Recouvrance élastique
«Delta» blanchi	1 575 g	15	2,43 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,08 ± 0,01	18,2 ± 1,4	4,2 ± 0,4
		30	2,89 ± 0,07	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,05 ± 0,01	10,9 ± 0,6	1,8 ± 0,1
	700 g	15	2,38 ± 0,05	0,76 ± 0,05	0,89 ± 0,06	0,13 ± 0,01	31,9 ± 2,4	8,4 ± 1,1
		30	2,68 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,75 ± 0,05	0,12 ± 0,01	23,3 ± 1,4	6,1 ± 0,6
«Delta» étuvé	1 575 g	15	2,57 ± 0,05	0,79 ± 0,07	1,11 ± 0,11	0,32 ± 0,05	30,8 ± 2,5	18,3 ± 3,7
		30	2,95 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,60 ± 0,06	0,09 ± 0,03	17,4 ± 1,1	3,4 ± 1,4
	700 g	15	2,36 ± 0,05	1,74 ± 0,05	2,10 ± 0,04	0,36 ± 0,02	73,9 ± 1,7	58,3 ± 3,9
		30	2,75 ± 0,05	1,61 ± 0,08	2,15 ± 0,09	0,54 ± 0,01	58,6 ± 2,8	48,3 ± 3,8

ou 1 575 g) sur la précision des mesures et sur le pouvoir discriminant des paramètres mesurés. Les résultats obtenus sont donnés tableau 2.

Bien que la précision absolue des mesures soit en général plus faible avec une force de 700 g, nous avons retenu de travailler avec cette force parce que les valeurs de fermeté et de recouvrance élastique varient dans de plus larges limites et que les valeurs du *t* de Student étant plus élevées (tabl. 3), le pouvoir discriminant de la méthode est supérieur.

TABLEAU 3

Comparaison des moyennes de fermeté et de recouvrance élastique mesurées avec des forces de 700 g ou de 1 575 g de riz « Delta » blanchi et étuvé : valeurs du t *de Student*

Caractéristique	Temps de cuisson (mn)	Force	
		700 g	1 575 g
Fermeté	15	31,04	9,47
	30	24,87	13,37
Recouvrance élastique	15	27,39	8,36
	30	24,35	2,51

c) *Répétabilité des mesures*

Ainsi que cela ressort des tableaux précédents, la répétabilité de la mesure du gonflement, de la fermeté et de la recouvrance élastique dans les conditions décrites dans le chapitre des méthodes est satisfaisante. Nous avons choisi de ne faire que 6 répétitions par temps de cuisson. En effet dans ces conditions, le gonflement est mesuré avec une erreur sur la moyenne des 6 mesures inférieure à 0,08 mm ce qui correspond à un coefficient de variation inférieur à 3,5 p. 100; la fermeté est mesurée à 4 unités près au maximum (coefficient de variation inférieur à 11 p. 100) et la recouvrance élastique à 1,5 unité près pour les faibles valeurs et à moins de 5,5 unités près pour les fortes valeurs, le coefficient de variation oscillant entre 9 et 18 p. 100.

2. — *Évolution des caractéristiques viscoélastiques du riz au cours de la cuisson*

Sur les figures 3, 4 et 5, nous avons reporté l'évolution du gonflement, de la fermeté et de la recouvrance élastique durant la cuisson de riz « Delta » blanchi ou étuvé.

On constate que le gonflement augmente régulièrement au fur et à mesure que la cuisson se prolonge et que les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes selon que le riz est étuvé ou simplement blanchi.

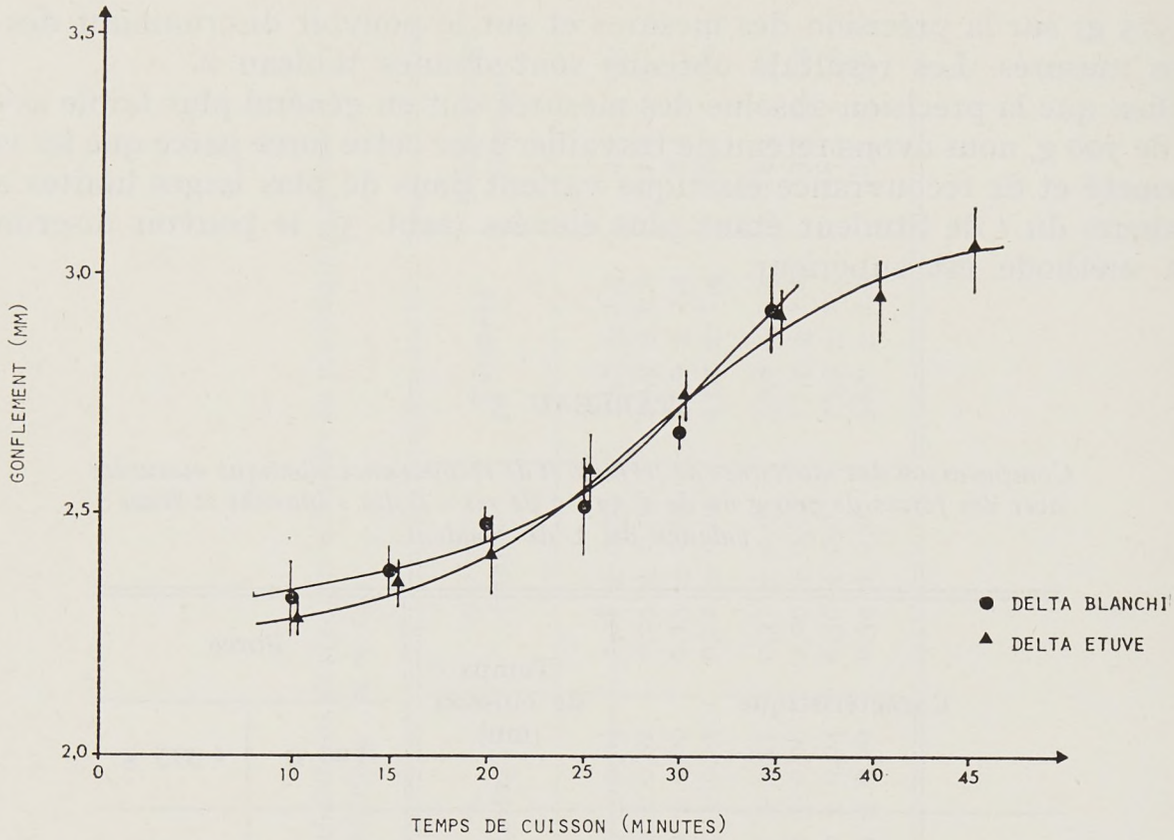


FIG. 3. — *Évolution du gonflement de riz « Delta » blanchi ou étuvé au cours de la cuisson.* (Intervalles de confiance pour P = 0,05)

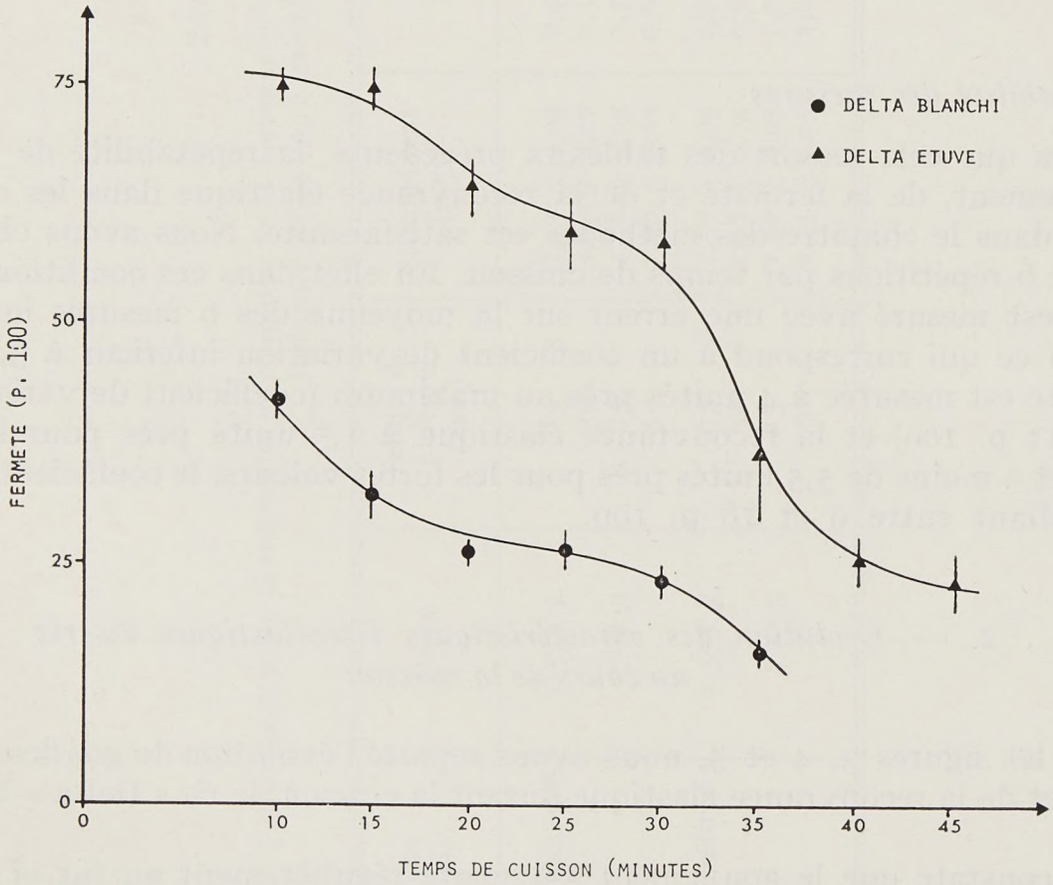


FIG. 4. — *Évolution de la fermeté de riz « Delta » blanchi ou étuvé au cours de la cuisson.* (Intervalles de confiance pour P = 0,05)

A l'inverse, la fermeté diminue au cours de la cuisson. Elle présente cependant un palier où elle n'évolue que peu, entre 20 et 30 min de cuisson, que le riz soit étuvé ou blanchi. Par contre, la fermeté du riz étuvé est très supérieure à celle du riz blanchi.

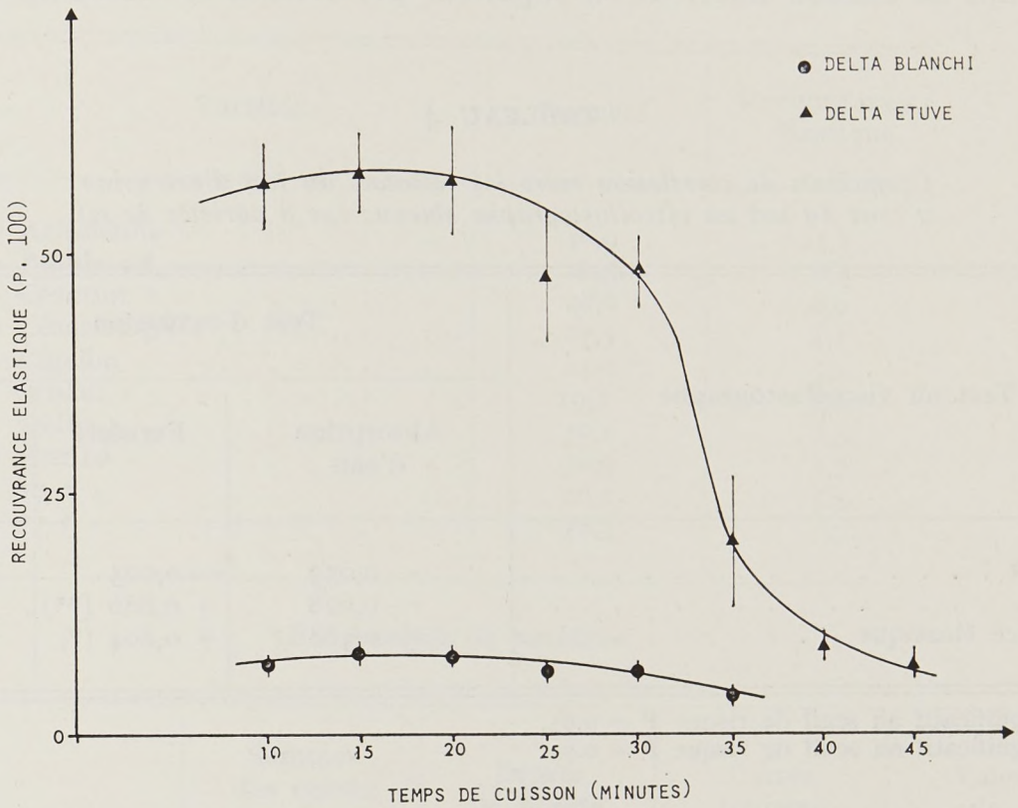


FIG. 5. — *Évolution de la recouvrance élastique de riz « Delta » blanchi ou étuvé au cours de la cuisson.* (Intervalles de confiance pour P = 0,05)

La recouvrance élastique augmente légèrement en début de cuisson puis baisse lentement dans le cas du riz blanchi et très rapidement dans le cas du riz étuvé. La recouvrance élastique du riz étuvé est très supérieure à celle du riz blanchi.

Il est intéressant de souligner que la fermeté et la recouvrance élastique du riz se maintiennent pratiquement au même niveau durant une dizaine de minutes alors que le gonflement augmente. Par ailleurs, lorsqu'on étudie plusieurs variétés de riz, on peut calculer une corrélation hautement significative entre les valeurs de fermeté et de recouvrance élastique ($r = 0{,}96$), les riz très fermes ont une recouvrance élastique élevée et leurs grains ont tendance à ne pas coller entre eux, ce dernier caractère étant apprécié subjectivement.

3. — *Correspondance entre les résultats fournis par le test au viscoélastographe et le test d'extrusion*

Selon LISCH et LAUNAY (1975), le test d'extrusion donne des renseignements voisins de ceux obtenus en utilisant la *Kramer Shear Press*. Mais ces auteurs font remarquer qu'avec ce type d'appareillage le traitement mécanique subi par le riz cuit est extrêmement complexe et difficile à interpréter. Ils ont cependant démontré qu'il y a une très bonne corrélation entre le travail fourni pendant l'essai à la *Kramer Shear Press* et la résistance à la compression de 4 grains de riz.

Nous avons calculé les coefficients de corrélation entre les résultats sur 8 variétés du test au viscoélastographe et ceux du test d'extrusion (tabl. 4); les premiers sont les valeurs moyennes des caractéristiques mesurées pour 10, 15, 20, 25, 30 et 35 min de cuisson, les seconds ont été obtenus pour une cuisson de 25 min et un temps de cuisson inférieur ou supérieur permettant le calcul du C_{200}.

TABLEAU 4

Coefficients de corrélation entre les résultats du test d'extrusion et ceux du test au viscoélastographe obtenus sur 8 variétés de riz

Test au viscoélastographe	Test d'extrusion		
	Absorption d'eau	Fermeté	C_{200}
Gonflement	— 0,053	— 0,005	— 0,248
Fermeté	— 0,628	+ 0,886 (**)	+ 0,501
Recouvrance élastique	— 0,468	+ 0,804 (*)	+ 0,569

(*) Significatif au seuil de risque P = 0.05.
(**) Significatif au seuil de risque P = 0.01.

La fermeté mesurée par le test au viscoélastographe est corrélée positivement à la fermeté mesurée par le test d'extrusion. Il en est de même de la recouvrance élastique. Les caractéristiques mesurées par le test d'extrusion semblent donc en liaison avec la résistance à la déformation et l'aptitude à retrouver leur forme initiale des grains de riz telles qu'on les apprécie avec le test au viscoélastographe.

4. — *Aptitude du test à différencier les variétés*

La variété de riz utilisée joue un rôle important dans la qualité culinaire (ALARY *et al.*, 1977). Nous avons cherché si les critères de fermeté et de recouvrance élastique mesurés au viscoélastographe permettaient de retrouver le classement des variétés classiquement admis par dégustation, en prenant les valeurs moyennes de fermeté et de recouvrance élastique mesurées au cours d'une cuisson de 10 à 35 min (tabl. 5).

On ne note pas de différences selon la forme du grain : des riz à grains longs peuvent avoir les mêmes caractéristiques viscoélastiques à l'état cuit que des riz à grains courts. D'après les analyses de variance, la fermeté apparaît comme un critère qui permet de mieux différencier les échantillons que la recouvrance élastique. Il est possible, en combinant les valeurs de la fermeté et de la recouvrance élastique de classer les variétés de riz en 4 groupes distincts :

— Groupe I : « Arlésienne » : cette variété possède tout au long de la cuisson une fermeté élevée, sa recouvrance élastique est particulièrement importante.

— Groupe II : « Delta », « Césariot » et « 77-2 » : la fermeté de ces variétés est assez forte, la recouvrance élastique est forte ou moyenne.

TABLEAU 5

Influence de la variété sur les caractéristiques viscoélastiques du riz cuit

5 A : Valeurs moyennes des fermetés et des recouvrances élastiques de différentes variétés de riz (durée de cuisson : 10-35 mn)

Variétés	Fermeté	Recouvrance élastique
« Arlésienne »	46,9	23,3
« Balilla 28 »	26,3	6,3
« Césariot »	28,8	6,9
« Césariot βθ »	27,5	4,1
« Cigalon »	24,9	5,1
« Cristal »	19,7	3,4
« Delta »	30,1	6,5
« Euribé »	26,9	5,7
« 77-1 »	26,2	5,5
« 77-2 »	30,3	7,9

5B : Analyse de variance

Fermeté

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « Variété »	2 674,30	9	297,40	42,28 (**)
Effet « Temps de cuisson »	5 907,02	5	1 181,40	172,06 (**)
Erreur	308,97	45	6,86	

Plus petite différence significative 5 p. 100 = 3,0 sur les variétés.

Recouvrance élastique

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « Variété »	1 766,67	9	196,29	23,48 (**)
Effet « Temps de cuisson »	503,10	5	100,62	12,04 (**)
Erreur	376,18	45	8,34	

Plus petite différence significative 5 p. 100 = 3,3 sur les variétés.

— Groupe III : « Césariot βθ », « Euribé », « Balilla 28 », « 77-1 » et « Cigalon » : ces variétés sont pratiquement équivalentes avec une fermeté et une recouvrance élastique moyennes.

— Groupe IV : « Cristal » : cette variété se caractérise par un manque de fermeté et de recouvrance élastique.

Nous retrouvons ainsi le classement des variétés établi en fonction de leur qualité culinaire (ALARY *et al.*, 1977).

5. — *Aptitude du test à différencier les traitements technologiques*

a) *Influence du degré d'usinage*

Nous avons testé avec du riz de la variété « Delta » l'effet sur les caractéristiques viscoélastiques de 4 degrés d'usinage évalués par la perte de poids par rapport au riz cargo : 0 p. 100, 8,5 p. 100, 13,5 p. 100 et 18 p. 100. Les pertes à l'usinage

TABLEAU 6

Influence du degré d'usinage sur les caractéristiques viscoélastiques du riz « Delta » après cuisson

6A : Influence du degré d'usinage

Perte de poids à l'usinage (p. 100)	Fermeté	Recouvrance élastique
0	71,5	31,2
8,5	32,8	7,3
13,5	30,1	6,5
18,0	26,5	5,5

6B : Analyse de variance

Fermeté

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « degré d'usinage »	7 929,59	3	2 643,19	286,52 (**)
Effet « temps de cuisson »	2 745,62	5	549,12	59,52 (**)
Erreur	138,37	15	9,22	

Recouvrance élastique

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « degré d'usinage »	2 766,25	3	922,08	327,79 (**)
Effet « temps de cuisson »	163,09	5	32,62	11,60 (**)
Erreur	42,20	15	2,81	

habituellement mesurées au laboratoire sont de l'ordre de 13, 5 p. 100, légèrement plus élevées que le taux de 9,5-10 p. 100 donné par la littérature (ANGLADETTE, 1966).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

Le degré d'usinage joue un rôle important dans la fermeté et la recouvrance élastique des riz cuits. Le riz cargo (0 p. 100 de perte à l'usinage) possède une fermeté et une recouvrance élastique très élevées, significativement différentes du riz blanchi. Dans les limites normales des pertes à l'usinage, entre 8,5 et 13,5 p. 100,

TABLEAU 7

Influence du degré d'étuvage sur les caractéristiques viscoélastiques du riz cuit

7A : Influence du degré d'étuvage et de la variété

Variété	Arlésienne		Delta	
Durée d'étuvage (mn)	Fermeté	Recouvrance élastique	Fermeté	Recouvrance élastique
Témoin	46,9	23,3	30,1	6,5
10	64,0	49,1	42,2	19,1
20	70,0	63,0	54,5	36,9
30	71,1	67,2	56,6	43,7

7B : Analyse de variance

Fermeté

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « Variété »	3 543,03	1	3 543,03	123,93 (**)
Effet « Durée d'étuvage »	4 878,46	3	1 626,15	56,88 (**)
Effet « Temps de cuisson »	5 313,12	5	1 062,62	57,17 (**)
Erreur	1 086,31	38	28,59	

Recouvrance élastique

	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeurs de F
Effet « Variété »	6 957,67	1	6 957,67	119,24 (**)
Effet « Durée d'étuvage »	11 919,77	3	3 973,26	68,13 (**)
Effet « Temps de cuisson »	3 645,75	5	729,15	12,50 (**)
Erreur	2 217,21	38	58,35	

on n'observe pas de différences significatives pour les deux critères étudiés. D'une manière générale, il semble cependant que la fermeté et la recouvrance élastique soient d'autant plus faibles que l'usinage est poussé.

La recouvrance élastique passe par une valeur maximale pour 15 min de cuisson; il semble que cette valeur maximale soit obtenue pour un temps de cuisson d'autant plus court que l'usinage est plus poussé.

b) *Influence du degré d'étuvage*

Deux variétés ont été étudiées : « Delta » couramment étuvé en Camargue et « Arlésienne » qui n'est plus cultivée mais dont les exceptionnelles qualités pour l'étuvage et l'appertisation ont été signalées (FEILLET et ALARY, 1975). On a comparé à un témoin non étuvé des riz étuvés pendant 10, 20 et 30 min. Les résultats sont donnés tableau 7.

L'étuvage provoque une augmentation de la fermeté et de la recouvrance élastique et on atteint des niveaux d'autant plus élevés que la variété de riz utilisée possède avant étuvage des propriétés d'élasticité différée plus marquées : ainsi le riz « Arlésienne » étuvé est toujours supérieur au riz « Delta » étuvé : après 30 min d'étuvage, le riz « Delta » n'a toujours pas atteint le niveau du riz « Arlésienne » étuvé seulement pendant 10 min. Au-delà de 20 min d'étuvage, le gain de fermeté et de recouvrance élastique est cependant faible.

Au cours de la cuisson, la fermeté du riz diminue d'autant plus lentement que l'étuvage a été prolongé. De plus cette baisse de la fermeté est plus faible pour le riz « Arlésienne » que pour le riz « Delta ». La recouvrance élastique est constamment décroissante tout au long de la cuisson pour le riz « Delta » étuvé alors qu'elle se maintient à un niveau constant et élevé pour le riz « Arlésienne » étuvé 30 min.

Nous confirmons ainsi l'amélioration de la qualité qu'il est possible d'obtenir en étuvant le riz (GARIBOLDI, 1974) et également que la variété de riz joue un rôle important sur l'amélioration de la qualité que l'on peut attendre de l'étuvage.

IV. — Conclusion

Le viscoélastographe est un appareil permettant d'apprécier la texture du riz au cours de la cuisson, élément essentiel de la qualité culinaire. Dans les conditions où nous nous sommes placés, nous avons étudié l'évolution des caractéristiques viscoélastiques des grains pour des temps de cuisson compris entre 10 et 35 min. Il est cependant possible d'utiliser le test au viscoélastographe pour une durée de 15-20 minutes de cuisson et de juger correctement l'échantillon de riz étudié.

Par ce test, nous avons montré que la fermeté et la recouvrance élastique du grain de riz cuit dépendent en particulier de la variété utilisée, de l'intensité de l'usinage et de l'intensité de l'étuvage. Le fait que les grains très fermes aient une recouvrance élastique élevée peut être un indice que cette recouvrance dépend de l'intégrité des grains après compression, donc de leur cohésion, c'est-à-dire de la force des liaisons internes maintenant la structure du produit. Le test au viscoélastographe peut être utilisé pour caractériser des lots de riz au niveau commercial, en renseignant à la fois sur la fermeté et la recouvrance élastique du riz cuit. A cause de la faible quantité de riz blanchi nécessaire, il est également adapté à la sélection précoce des riz pour la qualité culinaire et est ainsi plus performant que les autres méthodes d'appréciation de la texture du riz cuit.

Le test au viscoélastographe ne rend pas compte, pas plus que les autres méthodes proposées antérieurement, de la totalité de la qualité culinaire, en particulier le collant du riz n'est pas mesuré. Il permet de connaître avec précision les caractéristiques rhéologiques du riz cuit, abstraction faite des facteurs forme et dimension des grains.

Reçu pour publication en juin 1978.

Remerciements

Les échantillons de riz que nous avons étudiés nous ont été fournis par R. Marie et M. Grillard (I.N.R.A., Station d'Amélioration des Plantes, Montpellier) que nous remercions bien vivement.

Summary

Viscoelastic characteristics determination of cooked rice with a viscoelastograph

A new method to evaluate the viscoelastic characteristics of cooked rice with a viscoelastograph, is proposed. The viscoelastograph is a new apparatus which has been developped in our Laboratory for texture studies: samples are put between two horizontal plates; a constant weight is applied, then removed; the changes in sample thickness which occure during the test is recorded. In the case of cooked rice, for each experiment, three grains are tested simultaneously, a 700 g load is selected, the compression lasts 40 s and after removing of the weight, changes in grain thickness are recorded for 20 s. Each test is run 6 times at every cooking time. Swelling, firmess and elastic recovery are evaluated from the curve.

Cooking is found to increase swelling and to decrease firmness and elastic recorevy. The viscoelastograph test can be used to distinguish between rice varieties, to show how the rice viscoelastic characteristics decrease with the increase of milling degree and how firmness and elastic recovery are greatly increased by parboiling.

This method is suitable both for commercial and breeding purposes.

Références bibliographiques

Alary R., Redon C. et Laignelet B., 1977. Étude comparée de la qualité des variétés de riz français. *Bull. Riz. France*, **170**, 11-18.

Angladette A., 1966. Le riz. 930 p., G.P. Maisonneuve et Larose, éditeur, Paris.

Feillet P., Abecassis J. et Alary R., 1977. Description d'un nouvel appareil pour mesurer les propriétés viscoélastiques des produits céréaliers. *Bull. ENSMIC*, **278**, 97-101.

Feillet P. et Alary R., 1975. Étuvage du riz : influence des conditions de traitement et des facteurs variétaux sur les caractéristiques des produits finis. *Ann. Technol. Agric.*, **24**, 11-23.

Feillet P. et Redon C., 1971. Recherche des meilleures conditions d'utilisation de la microrizerie de laboratoire « Universale ». *Bull. Riz. France*, **136**, 11-17.

Gariboldi F., 1974. L'étuvage du riz. 93 p., FAO éditeur, Rome.

Hampel G., 1965. Untersuchungen für die Qualität von Weissreis. *Getreide und Mehl*, **11**, 132-136.

Lisch J. M. et Launay B., 1975. Appréciation instrumentale de la texture des riz appertisés. *Bull. Riz. France*, **157**, 15-26.

Manohar Kumar B., Upadhyay J. K. and Bhattacharya K. R., 1976. Objective tests for the stickiness of cooked rice. *J. Texture Studies*, **7**, 271-278.

Suzuki K., Kubota K., Omichi M. and Hosaka H., 1976. Kinetic studies on cooking of rice. *J. Food Sci.*, **41**, 1180-1183.

Szczesniak A. S., 1971. Consumer awareness of texture and other food attributes. II. *J. Texture Studies*, **2**, 196-206.

Tanaka M., 1975. General foods texturometer application to food texture research in Japan. *J. Texture Studies*, **6**, 101-116.

12

Ann. Technol. agric., 1978, **28** (4), 799-808.

Relation entre les propriétés viscoélastiques du gluten cuit, la teneur en protéines et la qualité culinaire des blés durs (*T. durum*)

R. DAMIDAUX et P. FEILLET

Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz, I.N.R.A.
Centre de Recherches Agronomiques de Montpellier
9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex

Résumé

Le gluten extrait d'une semoule de blé dur (*T. durum*) est moulé dans une cellule cylindrique qui est plongée dans l'eau bouillante (0 à 7 min.). La mesure des propriétés viscoélastiques de la pastille de gluten obtenue, déterminée avec un viscoélastographe, permet de définir la fermeté et la recouvrance absolue du gluten. De l'analyse de 24 échantillons (3 variétés × 8 provenances), une équation liant la qualité culinaire (y) à la teneur en protéines des blés (P) et à la recouvrance absolue du gluten thermoformé en 90 secondes (G) a été calculée : $y = 1{,}17\ P + 3{,}68\ G - 16{,}5$ ($r = 0{,}91$). G rendrait compte de la qualité intrinsèque des variétés de blé dur; sa mesure pourrait donc s'avérer intéressante pour les sélectionneurs.

Mots clés : *blé dur, qualité culinaire, gluten, protéine, viscoélasticité.*

I. — Introduction

Dans son acception la plus large, la qualité culinaire des blés durs (*T. durum*) est l'aptitude de cette céréale à être transformée en pâtes alimentaires qui soient fermes, non délitées et non collantes après cuisson, même si cette dernière a été excessivement prolongée. Dans la pratique, compte tenu de ce que la résistance au cisaillement (MATVEEF, 1966; WALSH, 1971) et les propriétés viscoélastiques (MATSUO et IRVINE, 1971; FEILLET, 1977) des pâtes cuites sont corrélées aux jugements (fermeté, masticabilité) portés sur ces dernières par analyse sensorielle (VOISEY et LARMOND, 1973; MATSUO et IRVINE, 1974), une définition plus restreinte dérivant implicitement des méthodes utilisées pour apprécier la texture des spaghetti cuits, est donnée. C'est ainsi qu'après MATSUO et IRVINE (1971), FEILLET *et al.* (1977*b*) associent la notion de qualité culinaire des blés durs à celle de viscoélasticité des spaghetti cuits qui en sont issus.

Si l'influence de la composition protéique des blés durs (*T. durum*) sur leur qualité culinaire n'est pas discutée (MATVEEF, 1966; MATSUO et IRVINE, 1970), le rôle respectif de la quantité et de la nature des protéines présentes n'est guère élucidé. Il est en effet courant d'affirmer que les protéines doivent être de bonne qualité, masquant ainsi sous un vocable aussi général que vague un manque à peu près complet de connaissance sur les bases physicochimiques de la qualité culinaire des pâtes alimentaires. Il semblerait néanmoins qu'une teneur élevée en gluténine, et plus précisément en sous unité 6 (PM = 53 000) (WASIK et BUSHUK, 1975*b*), exerce un effet bénéfique sur la fermeté des pâtes cuites (WALSH, 1971; MATSUO *et al.*, 1972. WASIK et BUSHUK, 1975*a*).

L'interprétation des travaux rapportés ci-dessus est compliquée par l'effet de la double interaction qualité × quantité des protéines et variété × milieu sur la qualité culinaire des blés durs. Une meilleure connaissance des relations pouvant exister entre la composition physico-chimique des protéines des blés et la qualité culinaire de ces derniers nous a semblé nécessiter une démarche plus analytique. Dans ce but, nous avons recherché les relations pouvant exister entre les propriétés rhéologiques du gluten, la teneur en protéines et la qualité culinaire des blés en tentant de faire la part entre ce que nous pouvons appeler la *qualité culinaire intrinsèque* d'une variété, dont la connaissance intéresse plus particulièrement le généticien et le sélectionneur, et la *qualité culinaire* des échantillons, seule à intéresser les industriels utilisateurs, et qui rend compte de la manière dont la qualité culinaire intrinsèque de chaque variété s'est exprimée dans un échantillon particulier suivant les conditions de développement des blés.

II. — Matériel et méthode

2.1. — *Blés durs*

On a analysé 8 échantillons, choisis de manière à couvrir une large gamme de teneur en protéines (10 à 19 p. 100 matière sèche), de chacune des 3 variétés de blé dur (*T. durum*) « Agathé », « Lakota » et « Durtal » dont les qualités culinaires intrinsèques sont considérées respectivement comme bonne, moyenne et insuffisante. Soient au total 24 échantillons récoltés en 1976, année au cours de laquelle la qualité culinaire moyenne des blés durs français a été exceptionnellement bonne. Un échantillon de la lignée expérimentale « V 39 », de mauvaise qualité culinaire intrinsèque a également été examiné.

2.2. — *Fabrication des semoules*

Après avoir été conditionnés à 16,5 p. 100 matière humide, les grains sont broyés dans un moulin Brabender Quadrumat Junior dont les écartements des cylindres sont respectivement réglés à 0,65 mm (B_1), 0,15 mm (B_2) et 0,08 mm (B_3) et dont la bluterie est équipée d'une gaze 30 GG (couverture de maille : 0,70 mm) dans les conditions décrites par ALAUSE (1971). Le rendement en semoules purifiées est d'environ 45 p. 100.

2.3. — *Détermination des propriétés viscoélastiques du gluten*

A. — *Fabrication des pastilles de gluten par thermoformage*

Le gluten est extrait des semoules dans les conditions habituelles (MAUZE *et al.*, 1972) par lixiviation d'un pâton dans de l'eau désionisée. On introduit 1 g de gluten humide et essoré dans une cellule B de thermoformage (fig. 1). Les pistons A sont placés de part et d'autre du gluten puis maintenus à l'aide du bâti de serrage C. L'ensemble est plongé pendant 0 à 420 secondes (durée standard : 90 secondes) dans 2 litres d'eau maintenue à ébullition, puis 120 secondes dans 1 litre d'eau à environ 20 °C. La pastille de gluten ainsi formée est retirée de la cellule B puis placée dans un cristallisoir rempli d'eau pendant environ une minute.

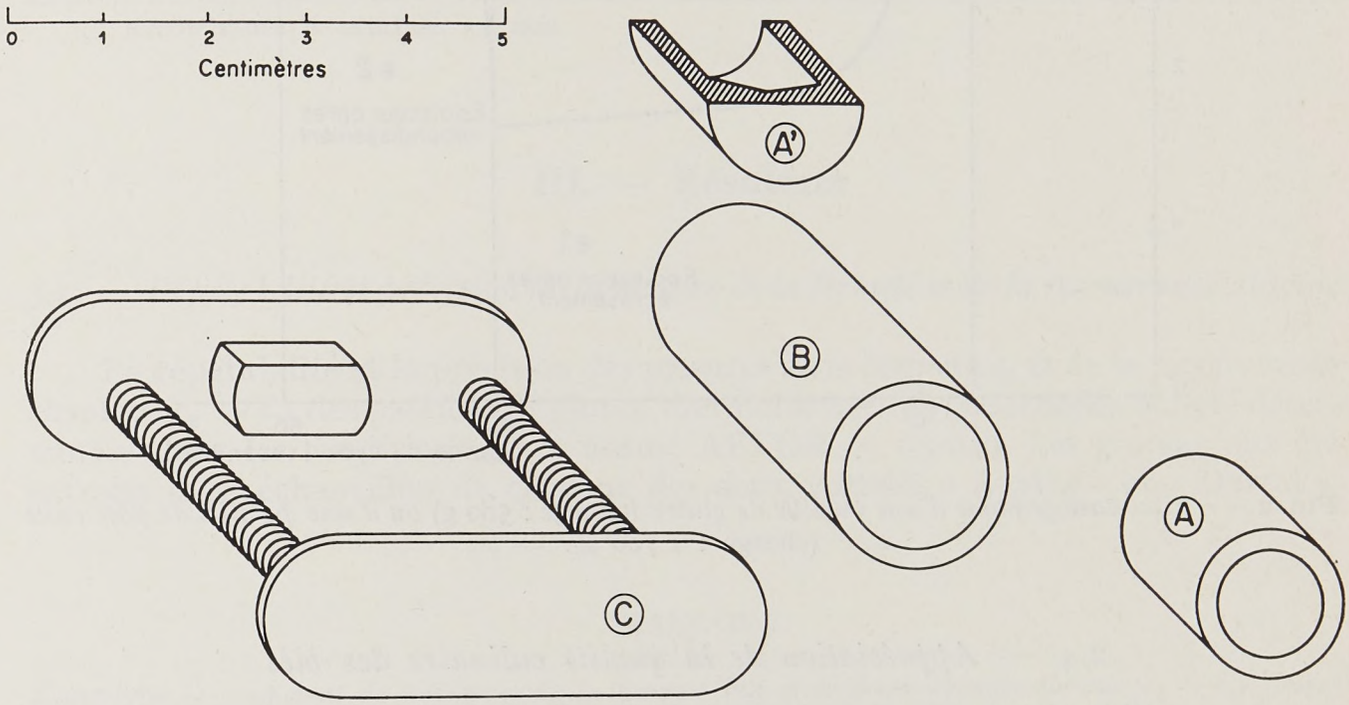


FIG. 1. — *Cellule de mise en forme du gluten.*

A et A' : Pistons en acier inoxydable.
B : Tube de verre PYREX.
C : Bâti de serrage.

B. — *Mesure des propriétés viscoélastiques des pastilles de gluten*

Les propriétés viscoélastiques des pastilles de gluten sont déterminées avec un viscoélastographe (FEILLET *et al.*, 1977*a*), appareil récemment conçu dans notre laboratoire qui permet de suivre la déformation d'un solide en fonction de la contrainte exercée et du temps : la pastille de gluten est retirée du cristallisoir puis placée entre deux plateaux horizontaux; une charge constante (500 g) est appliquée pendant 40 secondes perpendiculairement aux plateaux, puis enlevée; simultanément, on enregistre la variation d'épaisseur de la pastille en fonction du temps avant et après retrait de la charge (fig. 2). De la valeur des paramètres e_1 (épaisseur avant retrait de la charge) qui rend compte de la résistance à l'écrasement ou fermeté du gluten et e_2 (épaisseur finale 20 secondes après retrait de la charge), on déduit la recouvrance absolue ($e_2 - e_1$) mesurée en millimètres.

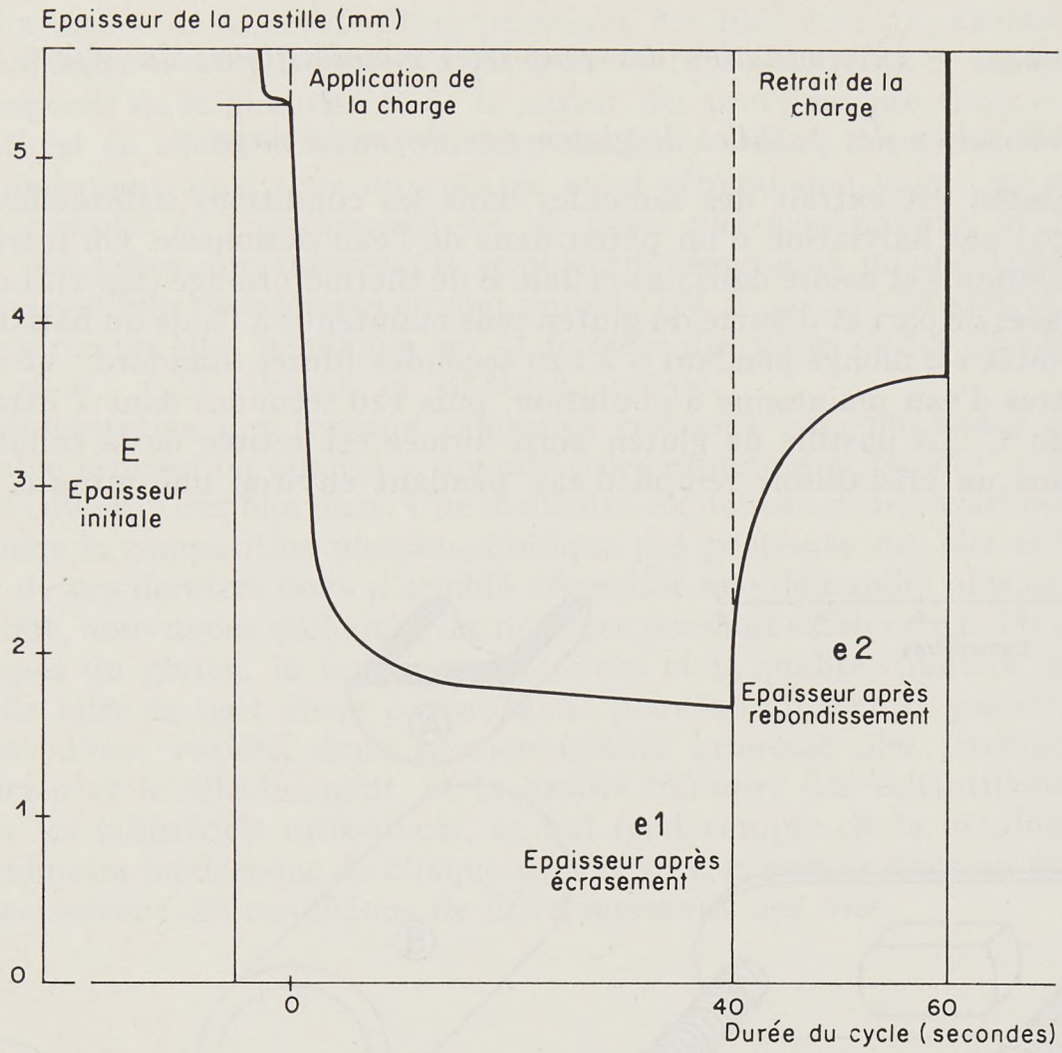


FIG. 2. — *Viscoélastogramme d'une pastille de gluten* (charge : 500 g) *ou d'une pastille de pâte cuite* (charge : 1 700 g).

2.4. — *Appréciation de la qualité culinaire des blés*

La qualité culinaire des échantillons de blés durs est appréciée dans les conditions récemment décrites par FEILLET *et al.* (1977*b*) : on ajoute à 10 g de semoule une quantité d'eau telle que l'humidité finale soit égale à 34 p. 100 (matière sèche). Le pâton formé après pétrissage manuel et 2 heures de repos est laminé jusqu'à ce que l'épaisseur finale de la lame de pâte obtenue soit égale à 0,95 ± 0,02 mm. Après compression de cette dernière (80 kg/cm^2), on découpe des pastilles de diamètre 7 mm qui sont laissées sécher pendant 36 heures en atmosphère stable et ventilée (température : 20 °C; humidité relative : 60 p. 100).

Les propriétés des pastilles cuites dans l'eau désionisée bouillante pendant 16, 24 et 32 minutes sont déterminées avec un viscoélastographe (charge : 1 700 g; durée d'application de la contrainte : 40 secondes; durée de la recouvrance : 20 secondes). De la valeur de la recouvrance absolue (e_2 — e_1) (fig. 2) on déduit la qualité de l'échantillon suivant le barème du tableau 1.

2.5. — *Teneurs en protéines*

La teneur en protéines des blés est déterminée par la méthode KJELDAHL, dans les conditions semi-automatiques décrites par FEILLET (1976). Le coefficient de transformation de l'azote en protéines est 5,7.

TABLEAU I

Barème de notation de la qualité culinaire des blés durs (T. durum) *en fonction de la valeur de la recouvrance absolue R (mm) des pastilles de pâtes cuites pendant 16, 24 et 32 minutes*

Temps de cuisson (min)	Note					
	0	2	4	6	8	10
16	< 0,1 (1)	0,1 ⩽ R < 0,3	⩾ 0,3	⩾ 0,3	⩾ 0,3	⩾ 0,3
24	—	—	< 0,1	0,1 ⩽ R < 0,3	⩾ 0,3	⩾ 0,3
32	—	—	—	—	< 0,1	⩾ 0,1

(1) Recouvrance R exprimée en mm.

III. — Résultats

3.1. — *Répétabilité et précision de la mesure de la fermeté et de la recouvrance absolue*

La répétabilité et la précision des mesures de la fermeté e_1 et de la recouvrance absolue $(e_2 - e_1)$ des pastilles de gluten thermoformées en 90 secondes ont été déterminées dans les conditions de la norme AFNOR × 05-020. Les glutens ont été extraits d'un échantillon de chacune des deux variétés « Agathé » et « Durtal ».

TABLEAU 2

Écart-type et coefficient de variation de la fermeté (e_1) *et de la recouvrance absolue* ($e_2 - e_1$), *(mm) des pastilles de gluten thermoformées en 90 secondes*

Variétés	Qualité culinaire intrinsèque de la variété	Nombre de mesures	Fermeté (e_1)			Recouvrance absolue ($e_2 - e_1$)		
			$\bar{x}$	σ	CV	$\bar{x}$	σ	CV
« Agathé »	Bonne	8	2,33	0,08	3	1,71	0,09	5
« Durtal »	Insuffisante	8	1,97	0,08	4	0,68	0,11	10

Il ressort du tableau 2 que l'écart type de la recouvrance absolue est sensiblement identique pour les deux échantillons examinés; de ce fait le coefficient de variation est d'autant plus faible que la recouvrance absolue est élevée. Il résulte de ces données que les valeurs de la recouvrance absolue sont fournies à ± 0,2 mm près lorsqu'une seule mesure est faite (P = 0,95) et à ± 0,14 mm pour deux mesures.

L'écart type et le coefficient de variation de la fermeté, semblables pour les deux variétés, sont respectivement égaux à 0,08 et 3 ou 4.

3.2. — *Influence de la durée du thermoformage sur les propriétés viscoélastiques du gluten*

Le gluten est extrait de trois variétés de blés durs « Agathé », « Lakota » et « V 39 » de qualité culinaire intrinsèque respectivement bonne, moyenne et mauvaise et de teneurs en protéines sensiblement équivalentes (environ 14,5 p. 100 matière sèche).

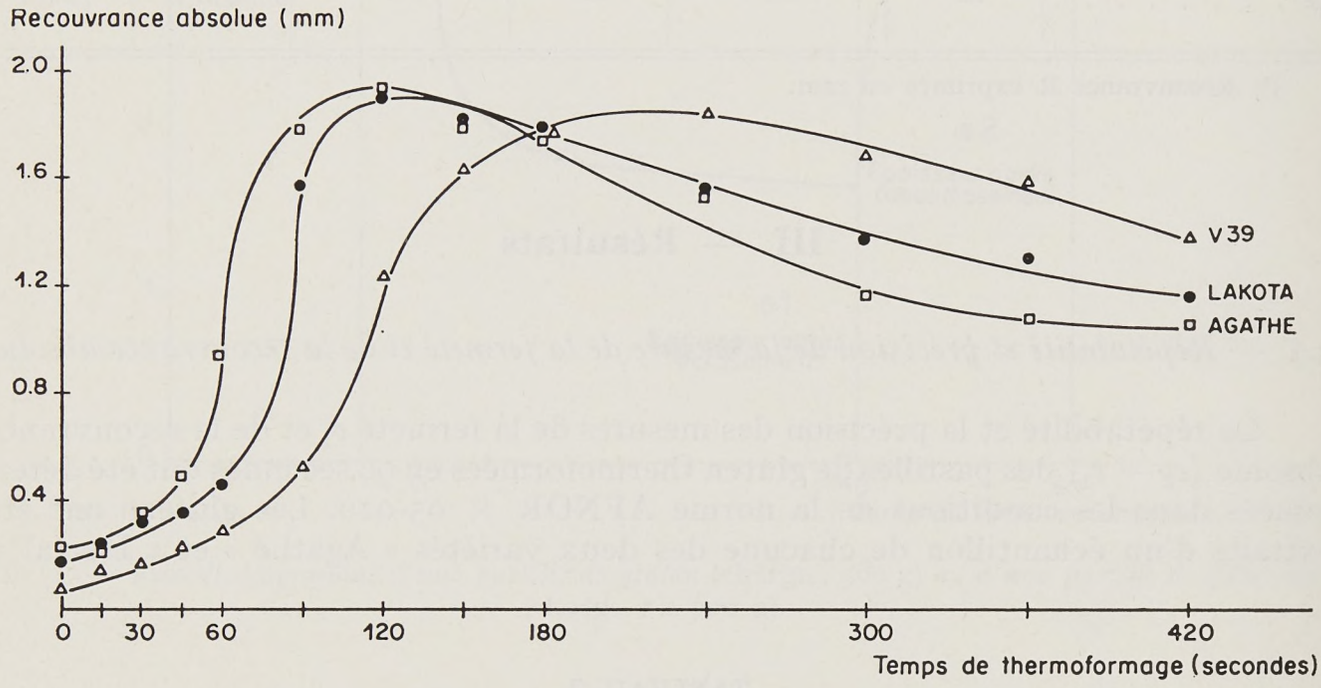


FIG. 3. — *Influence de la durée de thermoformage sur la recouvrance absolue* ($e_2 - e_1$) *du gluten de blé dur.*

Il est ensuite thermoformé selon les conditions précédemment décrites pendant des durées variables comprises entre 0 et 7 minutes.

Pour les trois variétés examinées, la fermeté e_1 augmente régulièrement avec la durée de thermoformage puis tend à se stabiliser après un traitement supérieur à 240 secondes; par ailleurs, et quelle que soit la durée de thermoformage, la fermeté est d'autant plus élevée que la qualité intrinsèque des variétés est meilleure; l'écart maximum (0,82 mm) entre les fermetés d' « Agathé » et « V 39 » est atteint après 150 secondes (tabl. 3).

L'évolution de la recouvrance absolue ($e_2 - e_1$) en fonction de la durée de thermoformage est tout à fait différente. La recouvrance absolue augmente tout d'abord rapidement, passe par un maximum puis baisse lentement. On observe par ailleurs : *a*) que ($e_2 - e_1$) est sensiblement identique pour les trois variétés lorsque le gluten n'est pas chauffé ($t = 0$); *b*) que l'écart entre les valeurs de la recouvrance absolue des trois échantillons est maximum après 90 secondes de thermoformage; *c*) que la durée du thermoformage correspondant à la valeur maximum de ($e_2 - e_1$) n'est pas la même pour les trois échantillons (fig. 3).

TABLEAU 3

Influence de la durée de thermoformage sur la fermeté (e_1) *du gluten de blé dur*

Durée de thermoformage (secondes)	Fermeté e_1 (mm)		
	Agathé	Lakota	V 39
0	1,27	1,20	0,99
15	1,33	1,37	1,16
30	1,57	1,49	1,20
45	1,68	1,62	1,33
60	1,87	1,78	1,44
90	2,31	2,22	1,73
120	2,75	2,56	2,03
150	3,15	2,96	2,33
180	3,10	3,04	2,60
240	3,52	3,37	3,00
300	3,89	3,70	3,30
360	4,01	3,75	3,38
420	4,02	3,92	3,61

3.3. — *Relation entre la teneur en protéines du blé, la fermeté et la recouvrance absolue du gluten*

La fermeté (e_1) et la recouvrance absolue ($e_2 - e_1$) du gluten thermoformé pendant 90 secondes et la teneur en protéines des blés ont été déterminées sur 8 échantillons de chacune des variétés « Agathé », « Lakota » et « Durtal » (tabl. 4).

Pour l'ensemble des 24 échantillons examinés, les valeurs moyennes de la teneur en protéines, de la fermeté et de la recouvrance absolue sont respectivement 14,5 p. 100 de matière sèche, 2,10 mm et 1,25 mm; les coefficients de variation correspondants sont égaux à 17,3, 11,0 et 36,8. Une analyse de régression linéaire montre qu'il existe une corrélation hautement significative ($r = 0,93$) entre les valeurs de la recouvrance absolue et de la fermeté, et que cette dernière est négativement corrélée à la teneur en protéines ($r = -0,44$); les valeurs de la recouvrance absolue et de la teneur en protéines sont indépendantes ($r = -0,24$).

Par contre, si on procède à l'examen des résultats variété par variété, on observe que la recouvrance absolue ($e_2 - e_1$) du gluten de la variété « Agathé » est sensiblement constante et indépendante de la teneur en protéines, mais que la recouvrance absolue de « Lakota » et « Durtal » et la fermeté d'« Agathé », « Lakota » et « Durtal » sont d'autant plus élevées que la teneur en protéines des blés est plus faible.

3.4. — *Relation entre la fermeté et la recouvrance absolue du gluten thermoformé, la teneur en protéines et la qualité culinaire des blés*

La qualité culinaire des 8 échantillons de chacune des trois variétés de blé « Agathé », « Lakota » et « Durtal » a été appréciée en déterminant les propriétés viscoélastiques de disques de pâtes cuites (tabl. 4).

TABLEAU 4

Teneur en protéines (N × 5,7 p. 100 m.s.), fermeté (e_1) *et recouvrance absolue* (e_2 — e_1) *du gluten thermoformé en 90 secondes et qualité culinaire (mesurée avec un viscoélastographe; notée de 0 à 10) de 8 échantillons de 3 variétés de blé dur* (T. durum) *de qualité culinaire intrinsèque bonne (AGATHE), moyenne (LAKOTA) et insuffisante (DURTAL).*

	AGATHE					LAKOTA					DURTAL				
	1	2	3	Qualité culinaire		1	2	3	Qualité culinaire		1	2	3	Qualité culinaire	
				4	5				4	5				4	5
	18,8	2,18	1,79	10	10	18,4	1,96	1,09	8	9	17,8	1,76	0,49	8	6
	16,4	2,27	1,74	10	9	17,8	1,90	0,99	8	8	16,8	1,67	0,46	6	5
	15,9	2,23	1,68	10	8	15,9	1,99	1,17	8	7	15,4	1,83	0,52	4	4
	15,0	2,31	1,79	8	8	15,0	2,14	1,38	4	6	14,5	2,01	0,87	4	4
	14,3	2,29	1,71	8	7	14,1	2,06	1,15	4	4	13,9	1,85	0,89	0	3
	13,2	2,40	1,80	6	6	13,6	2,04	1,20	4	4	12,7	2,03	1,12	0	3
	12,2	2,49	1,75	6	4	12,2	2,05	1,07	4	2	12,0	1,99	0,90	0	0
	10,7	2,59	1,85	4	3	10,6	2,32	1,64	0	2	10,3	2,02	1,18	0	0
x	14,6	2,35	1,76	7,75	6,87	14,7	2,06	1,21	5	5,25	14,2	1,90	0,78	2,7	3,12
σ	2,6	0,14	0,05	2,25		2,7	0,13	0,21	2,8		2,5	0,14	0,28	3,2	
CV	17,8	5,96	2,8	29,0		18,4	6,31	17,4	56		17,6	7,37	35,8	11,8	

1 : Teneur en protéines (N × 5,7 p. 100 m.s.); 2 : Fermeté du gluten (mm); 3 : Recouvrance absolue du gluten (mm); 4 : Note expérimentale; 5 : Note calculée suivant l'équation : Note : 1,17(N × 5,7 p. 100 m.s.) + 3,68 (Recouvrance absolue du gluten en mm.) — 16,5 avec 0 ⩽ Note ⩽ 10.

On observe qu'au sein d'une même variété, la qualité culinaire est d'autant meilleure que la teneur en protéines est élevée. Par ailleurs, et pour une même teneur en protéines, la qualité culinaire, la fermeté et la recouvrance absolue du gluten évoluent parallèlement.

Une analyse plus complète des résultats permet de montrer que la qualité culinaire est reliée à la teneur en protéines et à la recouvrance du gluten par l'équation :

Qualité culinaire = 1,17 (N × 5,7 p. 100 matière sèche) + 3,68 (recouvrance absolue du gluten — 16,5(Note de 0 à 10) en mm)

avec un coefficient de corrélation entre les valeurs théoriques calculées et les valeurs expérimentales égal à 0,91.

Il ressort de cette équation qu'un accroissement de la teneur en protéines de 10 à 15 p. 100 ou de la recouvrance du gluten de 0,5 à 2 augmente l'un ou l'autre la valeur de la qualité culinaire d'environ 5,5 points.

Il est important de souligner que *cette équation ne s'applique qu'aux 24 échantillons examinés et ne doit pas être généralisée.*

IV. — Discussion et conclusions

Les précédentes tentatives faites par d'autres auteurs pour relier les propriétés physiques du gluten à la qualité culinaire des blés durs n'ont guère abouti : les tendances générales qui pouvaient se dégager de l'analyse d'un nombre restreint d'échantillons étaient en effet contredites par de nombreuses exceptions.

Tous ces travaux, limités à l'étude du gluten cru, se heurtaient notamment à la fabrication d'une éprouvette de gluten de forme bien définie.

L'originalité du travail que nous avons réalisé réside dans le fait que le gluten est thermoformé avant analyse, ce qui lui confère une forme bien définie et des propriétés viscoélastiques nouvelles, et que ces dernières sont déterminées avec précision avec un viscoélastographe; à notre connaissance, des mesures de recouvrance n'avaient jamais été faites auparavant dans ces conditions.

Sur un plan fondamental, il serait particulièrement intéressant de préciser les modifications de la structure des protéines du gluten consécutives aux traitements thermiques qui rendent compte de l'évolution des propriétés viscoélastiques de celui-ci par thermoformage. A priori, on peut penser à la formation de nouvelles liaisons hydrophobes, voire même disulfures, et à la rupture de liaisons hydrogènes. Des études sont actuellement en cours pour préciser ce point.

Dans l'immédiat, certains de ces résultats pourraient conduire à la mise au point d'un nouveau test de sélection des blés durs pour leur qualité culinaire. La recouvrance absolue du gluten thermoformé en 90 secondes serait en effet une caractéristique variétale, d'autant moins sensible à la teneur en protéines des blés que sa valeur est élevée, qui — compte tenu des relations existant entre la qualité culinaire des blés, leur teneur en protéines et à la recouvrance absolue du gluten — pourrait rendre compte de la qualité culinaire intrinsèque des blés durs.

Il faut enfin se rappeler la définition restrictive donnée dans ce travail à la notion de qualité culinaire des blés durs. On ne saurait donc conclure des résultats présentés ici à l'existence d'une relation entre les propriétés viscoélastiques du gluten et le caractère collant ou délitescent des pâtes alimentaires cuites; par contre l'existence d'une relation entre les propriétés rhéologiques de ces dernières et celles du gluten cuit est clairement démontrée.

Reçu pour publication en juin 1978.

Summary

Viscoelastic properties of cooked gluten, protein content and durum wheat cooking quality

Firmness and absolute recovery of durum wheat (*T. durum*) gluten have been determined from a strain-time curve (creep recovery curve) recorded on a viscoelastograph (Load : 500 g); before measurement, the gluten ball was casted into a special cylindrical cell which was dipped into boiling water. Gluten viscoelastogram was determined for different dipping time (0 to 7 min.). Linear regression analysis has shown that durum wheat cooking quality (y) is related to wheat protein content (P) and absolute recovery of 90 sec heated gluten ball (G) according to the equation: $y = 1{,}17\ P + 3{,}68\ G - 16{,}5$ ($r = 0{,}91$). From these preliminary results (24 durum wheat samples analysed), there are strong evidences that determination of G could be a promising breeding tool for determining the intrinsic cooking value of durum wheat varieties.

Références bibliographiques

ALAUSE J., 1971. Description d'un petit sasseur de laboratoire. *Bull. E.F.M.*, **241**, 36-40.

FEILLET P., 1976. Dosage semi-automatique de la teneur en protéines des céréales par la méthode KJELDAHL. *Techn. Ind. Cer.*, **153**, 17-19.

FEILLET P., 1977. La qualité des pâtes alimentaires. *Ann. Nutr. Diet.*, **12**, 299-301.

FEILLET P., ABECASSIS J., ALARY R., 1977*a*. Description d'un nouvel appareil pour mesurer les propriétés viscoélastiques des produits céréaliers. Application à l'appréciation de la qualité du gluten, des pâtes alimentaires et du riz. *Bull. ENSMIC*, **278**, 97-101.

FEILLET P., ABECASSIS J., ALARY R., 1977*b*. Evaluation of the cooking value of durum wheat with a viscoelastograph. Symposium FAO, 7-9 Déc., Montpellier.

MATSUO R. R., IRVINE G. N., 1970. Effect of gluten on the cooking quality of spaghetti. *Cereal Chemistry*, **47**, 173-180.

MATSUO R. R., IRVINE G. N., 1971. Note on an improved apparatus for testing spaghetti tenderness. *Cereal Chem.*, **48**, 554-558.

MATSUO R. R., BRADLEY J. W., IRVINE G. N., 1972. Effect of protein content on the cooking quality of spaghetti. *Cereal Chemistry*, **49**, 707-711.

MATSUO R. R., IRVINE G. N., 1974. Relationship between the GRL spaghetti tenderness tester and sensory testing of cooked spaghetti. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, **7**, 155-156.

MATVEEF M., 1966. Influence du gluten des blés durs sur la valeur des pâtes alimentaires. *Bull. ENSMIC*, **213**, 133-138.

MAUZE C., RICHARD M., SCOTTI G., 1972. Guide pratique de contrôle de la qualité des blés. I.T.C.F., Paris.

VOISEY D. E., LARMOND E., 1973. Exploratory evaluation of instrumental techniques for measuring some textural characteristics of cook spaghetti. *Cereal Sci. To Day*, **18**, 126-143.

WALSH D. E., 1971. Measuring spaghetti firmness. *Cereal Sci. To Day*, **16**, 202-205.

WALSH D. E., GILLES K. A., 1971. The influence of protein composition on spaghetti quality. *Cereal Chemistry*, **48**, 544-554.

WASIK R. J., BUSHUK W., 1975*a*. Relation between molecular-weight distribution of endosperm proteins and spaghetti-making quality of wheats. *Cereal Chemistry*, **52**, 322-328.

WASIK R. J., BUSHUK W., 1975*b*. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of reduced glutenin of durum wheats of different spaghetti-making quality. *Cereal Chemistry*, **52**, 328-334.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 809-826.

Caractéristiques des amidons de plantes alimentaires tropicales

F. DELPEUCH, J. C. FAVIER et R. CHARBONNIERE *

avec la collaboration technique de Marie-Madeleine de BERRY

O.R.S.T.O.M., Centre pluridisciplinaire de l'Office National de la Recherche Scientifique et Technique, B.P. 193 Yaoundé (République Unie du Cameroun)

* *Laboratoire de Technologie alimentaire, I.N.R.A., C.E.R.D.I.A., 91305 Massy (France)*

Résumé

La ressource potentielle en amidon représentée par de nombreux végétaux tropicaux est très importante, mais l'extension des utilisations de leurs amidons implique une meilleure connaissance des caractéristiques et propriétés de ceux-ci. Trente amidons de plantes tropicales de divers genres, espèces et variétés ont été étudiées. Leur composition chimique, teneur en amylose, forme, taille et type d'organisation cristalline sont rapportés et comparés.

Les teneurs en amylose des grains d'amidon de variétés d'une même espèce sont souvent très voisines, mais des différences importantes sont aussi observées entre variétés de quelques espèces. Aucune relation n'apparaît entre le type d'organisation cristalline des grains d'amidon et leur teneur en amylose, alors que, sans avoir valeur de critère absolu, leur taille moyenne dominante peut laisser présumer de ce type : B, dans le cas des amidons à grains de dimensions supérieures à 30 µm, A ou C, pour la plupart des amidons à grains plus petits. Le type d'organisation cristalline est le même pour les amidons provenant de variétés d'une même espèce végétale, mais peut être identique ou différent lorsqu'il s'agit d'amidons issus d'espèces d'un même genre. La localisation des lieux de culture des végétaux ou l'année de la récolte n'ont aucune influence sur la teneur en amylose, la morphologie ou le type d'organisation cristalline des grains d'amidon.

Mots clés : *amidons tropicaux, composition, caractéristiques physiques.*

I. — Introduction

De nombreux végétaux de zone tropicale produisent des tubercules, des racines ou des fruits riches en amidon. Très souvent, ces productions végétales sont d'importance primordiale pour les populations locales, car elles sont à la base de leur alimentation. Bien que l'information les concernant présente encore des lacunes, les valeurs déduites des estimations statistiques publiées (F.A.O. 1975)

rendent déjà bien compte de leur ampleur, notamment par comparaison avec la production de pomme de terre en zone tropicale et dans le monde (tabl. 1). Toutes sont en augmentation par rapport aux estimations de COURSEY et HAYNES (1970), déduites des statistiques F.A.O. pour 1967.

TABLEAU I

Production estimée(*) de racines et tubercules alimentaires, en zone tropicale et dans le monde (en milliers de tonnes métriques)

	Manioc	Igname	Taro	Patate douce	Pomme de terre	Totaux
Amérique tropicale et Caraïbes	29 992	48	—	2 132	5 868	38 040
Asie tropicale et Océanie	28 241	230	344	7 594	6 750	43 159
Afrique tropicale	43 972	19 539	3 569	5 571	1 407	74 058
Totaux	102 205	19 817	3 913	15 297	14 025	155 257
Production totale mondiale	105 209	20 198	4 502	136 570	291 321	557 800

(*) Valeurs dérivées de l'Annuaire F.A.O. de la Production, 1975, **29**, 80-87.

Les rendements potentiels énormes des végétaux considérés leur confèrent un grand intérêt, non seulement pour l'alimentation humaine mais aussi pour l'alimentation animale et pour les applications industrielles de l'amidon. Pourtant, actuellement encore, leur utilisation reste le plus souvent limitée à des préparations alimentaires artisanales. Cet aspect n'est sans doute pas étranger au fait que les amidons des végétaux tropicaux ont été beaucoup moins étudiés que les amidons usuels, alors que la valorisation rationnelle d'un amidon implique la connaissance préalable de ses propriétés. Aussi, depuis quelques années, certains d'entre eux font-ils l'objet d'études en Afrique occidentale, en Inde, au Brésil, à Porto Rico, notamment ceux d'igname (*Dioscorea*) BERRIOS et GONZALEZ, 1971, BRENNAN et SODAH AYERNOR, 1973, FAVIER, 1969, HOLLO et GUILBOT, 1964, MARTIN et THOMPSON, 1971, MIEGE, 1948, 1957, RAO et BERI, 1952, 1955, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, RASPER et COURSEY, 1967, ROSENTHAL *et al.*, 1972, 1974), de taro (*Colocasia antiquorum*) (FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, HIGASHIHARA *et al.*, 1975), de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de patate douce (*Ipomoea batatas*) (FAVIER, 1969, RAO et BERI, 1952, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de fruit de l'arbre à pain (*Artocarpus communis*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, CORREA *et al.*, 1970, FAVIER, 1969, ROSENTHAL *et al.*, *a*) 1974), de banane plantain (*Musa paradisiaca*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de légumineuses (*Leguminosea*) (ROSENTHAL et ESPINOLA, 1969, ROSENTHAL et NAKAMURA, 1972, ROSENTHAL *et al.*, 1970, 1971, *a*) *b*), 1974) et de quelques autres végétaux indigènes (ABD-ALLAH *et al.*, 1974, BERRIOS et GONZALES, 1971, FAVIER, 1969, RAO et BERI,

1952, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, ROSENTHAL et ESPINOLA, 1969, SRIVASTAVA *et al.*, 1970).

Afin de recueillir des données susceptibles d'aider à la promotion d'utilisations nouvelles, artisanales ou industrielles, alimentaires ou non, pour des amidons de végétaux de zone tropicale camerounaise, leur composition chimique, leur morphologie, leur structure et certaines de leurs propriétés ont été étudiées. L'acquisition de données nombreuses est en effet nécessaire en raison de la variété des utilisations possibles d'un amidon et compte tenu de ce que le grain d'amidon constitue une entité complexe dont les propriétés dépendent de paramètres multiples. Par exemple, le fait qu'à l'état cru certains amidons ne résistent que partiellement aux processus d'hydrolyse intervenant dans leur utilisation digestive, alors que d'autres sont totalement indigestibles, ne peut être qu'en relation avec leur composition chimique et leur structure. D'autre part, la digestibilité d'un amidon étant améliorable par un traitement thermique convenable (FAVIER, 1969, CERNING-BEROARD et LE DIVIDICH, 1976, LE DIVIDICH, 1977), la connaissance de ses propriétés physicochimiques peut aussi aider à comprendre l'action du traitement. C'est ainsi que pour appréhender le comportement d'un amidon à une cuisson, il est nécessaire de connaître non seulement sa composition chimique, sa teneur en amylose (RAO *et al.*, 1952), sa structure, mais aussi ses propriétés de gonflement et de solubilisation. Il en va de même pour ses aptitudes à des transformations technologiques, telles la fabrication de films protecteurs (DEATHERAGE *et al.*, 1954, 1955, WOLF *et al.*, 1951) ou d'agents épaississants. L'étude des propriétés physicochimiques d'un amidon se situe donc au premier stade d'une recherche de développement. Par ailleurs, l'étude biochimique peut apporter aussi des données intéressantes puisque la sensibilité d'un amidon à une dégradation alpha-amylasique *in vitro* n'est pas sans rapport avec sa digestibilité *in vivo* (AUMAITRE *et al.*, 1969).

La présente publication concerne seulement des données chimiques et physiques. La dégradation alpha-amylasique des amidons, leur gonflement et leur solubilité dans l'eau en fonction de la température seront décrits dans un autre article.

II. — Matériel et méthodes

2.1. — *Matériel*

Les amidons ont été extraits de la fraction comestible de végétaux à tubercules ou racines alimentaires et de végétaux à fruits féculents.

Les végétaux du premier groupe comprennent :

— huit espèces d'igname (*Dioscorea*) : *D. rotundata* (deux variétés), *D. cayenensis* (deux variétés), *D. schimperiana*, *D. bulbifera*, *D. esculenta*, *D. alata*, *D. libreschiana*, *D. dumetorum* (trois variétés);
— deux variétés de manioc (*Manihot esculenta*);
— trois variétés de patate douce (*Ipomoea batatas*);
— deux variétés de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*);
— trois variétés de taro (*Colocasia antiquorum*);
— une carotte indigène (*Coleus esculentus*);
— un haricot-igname (*Pachyrrhizus erosus*), légumineuse à tubercules, peu connue au Cameroun mais consommée dans certains pays tropicaux (Indonésie, Mexique).

rendent déjà bien compte de leur ampleur, notamment par comparaison avec la production de pomme de terre en zone tropicale et dans le monde (tabl. 1). Toutes sont en augmentation par rapport aux estimations de COURSEY et HAYNES (1970), déduites des statistiques F.A.O. pour 1967.

TABLEAU I

Production estimée(*) de racines et tubercules alimentaires, en zone tropicale et dans le monde (en milliers de tonnes métriques)

	Manioc	Igname	Taro	Patate douce	Pomme de terre	Totaux
Amérique tropicale et Caraïbes	29 992	48	—	2 132	5 868	38 040
Asie tropicale et Océanie	28 241	230	344	7 594	6 750	43 159
Afrique tropicale	43 972	19 539	3 569	5 571	1 407	74 058
Totaux	102 205	19 817	3 913	15 297	14 025	155 257
Production totale mondiale	105 209	20 198	4 502	136 570	291 321	557 800

(*) Valeurs dérivées de l'Annuaire F.A.O. de la Production, 1975, **29**, 80-87.

Les rendements potentiels énormes des végétaux considérés leur confèrent un grand intérêt, non seulement pour l'alimentation humaine mais aussi pour l'alimentation animale et pour les applications industrielles de l'amidon. Pourtant, actuellement encore, leur utilisation reste le plus souvent limitée à des préparations alimentaires artisanales. Cet aspect n'est sans doute pas étranger au fait que les amidons des végétaux tropicaux ont été beaucoup moins étudiés que les amidons usuels, alors que la valorisation rationnelle d'un amidon implique la connaissance préalable de ses propriétés. Aussi, depuis quelques années, certains d'entre eux font-ils l'objet d'études en Afrique occidentale, en Inde, au Brésil, à Porto Rico, notamment ceux d'igname (*Dioscorea*) BERRIOS et GONZALEZ, 1971, BRENNAN et SODAH AYERNOR, 1973, FAVIER, 1969, HOLLO et GUILBOT, 1964, MARTIN et THOMPSON, 1971, MIEGE, 1948, 1957, RAO et BERI, 1952, 1955, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, RASPER et COURSEY, 1967, ROSENTHAL *et al.*, 1972, 1974), de taro (*Colocasia antiquorum*) (FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, HIGASHIHARA *et al.*, 1975), de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de patate douce (*Ipomoea batatas*) (FAVIER, 1969, RAO et BERI, 1952, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de fruit de l'arbre à pain (*Artocarpus communis*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, CORREA *et al.*, 1970, FAVIER, 1969, ROSENTHAL *et al.*, *a*) 1974), de banane plantain (*Musa paradisiaca*) (BERRIOS et GONZALEZ, 1971, FAVIER, 1969, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971), de légumineuses (*Leguminosea*) (ROSENTHAL et ESPINOLA, 1969, ROSENTHAL et NAKAMURA, 1972, ROSENTHAL *et al.*, 1970, 1971, *a*) *b*), 1974) et de quelques autres végétaux indigènes (ABD-ALLAH *et al.*, 1974, BERRIOS et GONZALES, 1971, FAVIER, 1969, RAO et BERI,

1952, RASPER, *a*) *b*) 1969, 1971, ROSENTHAL et ESPINOLA, 1969, SRIVASTAVA *et al.*, 1970).

Afin de recueillir des données susceptibles d'aider à la promotion d'utilisations nouvelles, artisanales ou industrielles, alimentaires ou non, pour des amidons de végétaux de zone tropicale camerounaise, leur composition chimique, leur morphologie, leur structure et certaines de leurs propriétés ont été étudiées. L'acquisition de données nombreuses est en effet nécessaire en raison de la variété des utilisations possibles d'un amidon et compte tenu de ce que le grain d'amidon constitue une entité complexe dont les propriétés dépendent de paramètres multiples. Par exemple, le fait qu'à l'état cru certains amidons ne résistent que partiellement aux processus d'hydrolyse intervenant dans leur utilisation digestive, alors que d'autres sont totalement indigestibles, ne peut être qu'en relation avec leur composition chimique et leur structure. D'autre part, la digestibilité d'un amidon étant améliorable par un traitement thermique convenable (FAVIER, 1969, CERNING-BEROARD et LE DIVIDICH, 1976, LE DIVIDICH, 1977), la connaissance de ses propriétés physicochimiques peut aussi aider à comprendre l'action du traitement. C'est ainsi que pour appréhender le comportement d'un amidon à une cuisson, il est nécessaire de connaître non seulement sa composition chimique, sa teneur en amylose (RAO *et al.*, 1952), sa structure, mais aussi ses propriétés de gonflement et de solubilisation. Il en va de même pour ses aptitudes à des transformations technologiques, telles la fabrication de films protecteurs (DEATHERAGE *et al.*, 1954, 1955, WOLF *et al.*, 1951) ou d'agents épaississants. L'étude des propriétés physicochimiques d'un amidon se situe donc au premier stade d'une recherche de développement. Par ailleurs, l'étude biochimique peut apporter aussi des données intéressantes puisque la sensibilité d'un amidon à une dégradation alpha-amylasique *in vitro* n'est pas sans rapport avec sa digestibilité *in vivo* (AUMAITRE *et al.*, 1969).

La présente publication concerne seulement des données chimiques et physiques. La dégradation alpha-amylasique des amidons, leur gonflement et leur solubilité dans l'eau en fonction de la température seront décrits dans un autre article.

II. — Matériel et méthodes

2.1. — *Matériel*

Les amidons ont été extraits de la fraction comestible de végétaux à tubercules ou racines alimentaires et de végétaux à fruits féculents.

Les végétaux du premier groupe comprennent :

— huit espèces d'igname (*Dioscorea*) : *D. rotundata* (deux variétés), *D. cayenensis* (deux variétés), *D. schimperiana*, *D. bulbifera*, *D. esculenta*, *D. alata*, *D. libreschiana*, *D. dumetorum* (trois variétés);
— deux variétés de manioc (*Manihot esculenta*);
— trois variétés de patate douce (*Ipomoea batatas*);
— deux variétés de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*);
— trois variétés de taro (*Colocasia antiquorum*);
— une carotte indigène (*Coleus esculentus*);
— un haricot-igname (*Pachyrrhizus erosus*), légumineuse à tubercules, peu connue au Cameroun mais consommée dans certains pays tropicaux (Indonésie, Mexique).

Dans le cas de l'igname *D. dumetorum*, deux variétés ont été cultivées deux années de suite à YAOUNDÉ (Centre-Sud Cameroun) et à la Station de Recherches d'Agronomie Tropicale (I.R.A.T.) de BAMBUI (Nord-Ouest Cameroun), située à 1 300 mètres d'altitude. A l'exception du haricot-igname, cultivé à YAOUNDÉ, tous les autres végétaux proviennent de la Station de BAMBUI.

Les végétaux du second groupe, tous du Jardin Botanique de Yaoundé, comprennent deux espèces d'*Artocarpus* : *A. integra* (jaquier) et *A. communis*, variétés « seminifera » et « apyrena » (véritable arbre à pain). Dans le cas de *A. integra* et *A. communis* « seminifera », l'amidon provient des graines comestibles de leurs fruits, tandis que dans le cas de *A. communis* « apyrena », à fruits dépourvus de graines, il provient de la pulpe.

2.2. — *Méthodes*

2.21. *Extraction de l'amidon*

Après épluchage, le matériel amylacé est broyé, à température ambiante, en présence d'une solution de chlorure mercurique à 0,01 M. La bouillie obtenue est ensuite passée à travers une mousseline à mailles de 0,25 mm. Le lait d'amidon recueilli est alors lavé à l'eau permutée, puis décanté. Après plusieurs lavages et décantations successifs, le produit résiduel est dispersé et agité dans un mélange à un volume de toluène pour neuf volumes de solution aqueuse de chlorure de sodium à 4 p. 100, afin de séparer les protéines de l'amidon du milieu. Après une nouvelle série de lavages à l'eau permutée, alternant avec des décantations, la suspension est séchée à une température inférieure à 45 °C. Finalement, le produit sec est broyé modérément et passé à travers un tamis à mailles de 0,25 mm.

2.22. *Examens chimiques*

Ils comprennent les déterminations suivantes :
— teneur en eau : par dessiccation à 104-107 °C, jusqu'à masse constante;
— teneur en amidon : par la méthode de DIMLER (1964);
— teneur en cendres : par calcination à 550 °C durant 8 heures;
— teneur en protéines (N × 6,25) : par la microméthode de KJELDAHL;
— teneur en lipides : par extraction au Soxhlet avec l'éther de pétrole;
— teneur en indigestible glucidique (insoluble formique) : par la technique à l'acide formique, de GUILLEMET et JACQUOT (1943);
— teneur apparente en amylose : par titrage ampérométrique de l'iode lié par l'amylose de l'amidon, suivant la méthode de BEMILLER (1964), en opérant à 20 °C et en prenant la valeur 19,9 pour coefficient théorique d'absorption de l'iode par l'amylose pure.

2.23. *Examens en microscopie*

Ils ont été effectués par microscopie optique, en lumière ordinaire et en lumière polarisée, et par microscopie à balayage (appareil JEOL, type 50 A). Les dimensions des grains d'amidon ont été déterminées au microscope optique, en utilisant la technique de Mac MASTERS (1964).

2.24. *Examens par diffraction de rayons X*

Les spectres de diffraction de rayons X ont été obtenus avec un spectrodiffractomètre C.G.R.(*) muni d'un monochromateur sélectionnant la radiation K_α d'une anticathode de cuivre. Le rayonnement diffracté était détecté par un compteur à scintillations et son intensité enregistrée en fonction des angles θ de BRAGG, à la vitesse de 1° θ en 4 min. L'inertie du comptage de photons X était de 10 s et la vitesse de déroulement du papier d'enregistrement de 8,5 mm /s. Tous les spectres ont été réalisés par la méthode de montage en transmission, suivant une technique déjà décrite (CHARBONNIERE *et al.*, 1968). Pour leur examen, les amidons ont été amenés à une hydratation voisine de 30 p. 100, par rapport à la masse pondérale de matière sèche, proportion pour laquelle les intensités des raies spectrales avoisinent leur optimum.

III. — Résultats et discussion

3.1. — *Composition chimique et teneur en amylose des amidons*

Les proportions d'amidon, cendres, protéines, lipides, insoluble formique et amylose dans le matériel amylacé extrait sont indiquées aux tableaux 2 et 3. Elles sont exprimées en p. 100 de la masse pondérale de matière sèche des extraits

TABLEAU 2

Composition chimique d'amidons d'ignames

Origine de l'amidon	Amidon	Cendres	Protéines	Lipides	Insoluble formique	Amylose
D. alata ex Bafut	96,2	0,17	2,21	0,62	1,41	23,0
D. bulbifera ex Gwofon . .	97,7	0,01	0,97	0,24	0,30	26,6
D. libreschiana	99,0	0,13	0,40	0,20	0,16	34,5
D. schimperiana	84,1	1,06	4,47	0,35	10,90	17,3
D. rotundata ogoja.	97,2	0,31	1,70	(*)	0,39	23,0
D. rotundata conique. . . .	97,0	0,10	1,07	0,28	0,57	21,7
D. cayenensis long	98,7	0,03	0,59	0,10	0,09	22,0
D. cayenensis digité	97,8	0,04	1,40	(*)	0,27	19,5
D. esculenta	97,9	0,18	0,21	0,43	0,11	13,5
D. dumetorum hirsute jaune (BAMBUI 1970)	97,2	0,14	1,14	(*)	0,22	10,3
D. dumetorum hirsute jaune (YAOUNDE 1971)	98,1	0,16	1,15	0,24	0,05	10,2
D. dumetorum lisse jaune (BAMBUI 1970)	97,7	0,18	1,81	(*)	(*)	10,2
D. dumetorum lisse jaune (BAMBUI 71)	97,1	0,32	1,82	0,19	0,07	11,2
D. dumetorum lisse blanc (BAMBUI 70)	98,0	0,11	1,64	(*)	(*)	10,4
D. dumetorum lisse blanc (YAOUNDE 1971)	97,6	0,20	1,33	0,15	0,11	9,7

(*) Non déterminé.

(*) Compagnie Générale de Radiologie.

TABLEAU 3

Composition chimique d'amidons de végétaux tropicaux
(autres que les ignames)

Origine de l'amidon	Amidon	Cendres	Protéines	Lipides	Insoluble formique	Amylose
TARO						
Colocasia antiquorum :						
blanc gros tubercules . .	97,4	0,18	1,08	0,18	0,28	14,2
rouge ex Knambe . . .	94,3	0,31	2,42	0,28	1,37	17,3
petite taille ex Bafut . .	97,7	0,30	2,09	0,25	0,54	9,5
MANIOC						
Manihot esculenta :						
rouge	98,3	0,01	0,21	0,57	0,14	16,9
blanc.	99,4	0,01	0,24	0,22	0,12	17,1
CAROTTE LOCALE						
Coleus esculentus	97,9	0,11	0,97	(*)	(*)	14,8
MACABO						
Xanthosoma sagittifolium :						
rouge	98,5	0,11	1,11	0,08	0,52	22,8
blanc.	98,1	0,08	0,57	0,14	0,41	21,1
JACQUIER						
Artocarpus integra (graines).	97,7	0,01	0,26	(*)	0,16	22,7
ARBRE A PAIN						
Artocarpus communis :						
apyrena (pulpe)	97,0	0,19	0,46	0,14	0,71	9,2
seminifera (graines) . . .	93,3	0,35	0,63	0,34	0,46	21,8
PATATE DOUCE						
Ipomoea batatas :						
jaune ex America	98,7	0,08	0,51	0,26	0,07	17,8
blanche ex Menjo	98,8	0,10	0,54	0,60	0,13	17,5
rouge ex Nkolbisson . .	98,0	0,10	0,48	0,06	0,18	18,3

(*) Non déterminé.

purifiés, sauf la teneur en amylose qui est rapportée à la masse pondérale d'amidon pur sec.

Les amidons extraits contiennent de 1 à 3 p. 100 de substances non amylacées, excepté l'amidon de l'igname *D. schimperiana* qui s'est révélé difficile à purifier et en contient près de 16 p. 100, principalement des matières cellulosiques (10,9

p. 100) et des protéines (4,5 p. 100). Pour les autres amidons, les teneurs en protéines sont nettement plus faibles, comprises entre 0,2 et 2,5 p. 100. Les teneurs en matières cellulosiques, lipides et cendres sont, à quelques faibles écarts près, respectivement inférieures à 0,6, 0,6 et 0,4 p. 100.

Parmi les amidons d'ignames, ceux des variétés de l'espèce *D. dumetorum* ont les teneurs en amylose les plus basses, toutes voisines de 10 p. 100. L'amidon de *D. libreschiana* a la teneur la plus élevée, 34,5 p. 100. Les amidons des autres ignames ont des teneurs intermédiaires, comprises le plus souvent entre 19 et 23 p. 100, valeurs de l'ordre de celles trouvées au Ghana (RASPER et COURSEY, 1967) pour les mêmes espèces et comparables à celles relatives aux amidons de pomme de terre ou d'arrow root (*Maranta arundinacea*). Toutefois, pour l'amidon d'une variété non précisée d'une igname de l'espèce *D. rotundata* cultivée à Porto Rico, BERRIOS et GONZALEZ (1971) trouve une teneur en amylose de 34 p. 100, valeur nettement plus élevée que celle rapportée ici pour la variété « ogoja » (23,7 p. 100) ou la variété à tubercules coniques (21,7 p. 100). Peut être s'agit il d'une variété différente, car il ne semble pas que les conditions écologiques interviennent notablement sur la teneur en amylose des amidons considérés, celle-ci se révélant sensiblement la même dans le cas d'amidons issus de récoltes différentes (1970 et 1971) ou obtenues en des lieux d'altitude et de climat différents (YAOUNDE et BAMBUI).

Les teneurs en amylose des amidons des trois variétés de patates douces examinées ne présentent pas de différences significatives (17,8, 17,5 et 18,3 p. 100), ni celles des amidons des deux variétés de manioc (16,9 et 17,1 p. 100) et de macabo (22,8 et 21,1 p. 100). Par contre, dans le cas du taro, l'amidon de la variété « ex Bafut » a une teneur en amylose nettement plus basse que les amidons des autres variétés, soit 9,5 contre 14,2 et 17,3 p. 100. De même, les amidons des deux variétés de fruits à pain ont des teneurs en amylose très différentes, 21,8 p. 100 pour *A. communis* « seminifera », valeur également trouvée par CORREA (1970), et 9,2 p. 100 pour *A. communis* « apyrena », mais il s'agit d'amidon de graines dans le premier cas et de pulpe dans le second. Ces résultats montrent que si les amidons de variétés de certaines espèces végétales comportent souvent des teneurs en amylose de même ordre (cf. *D. dumetorum, D. rotundata, Manihot esculenta, Ipomoea batatas, Xanthosoma sagittifolium*), la remarque ne saurait apparemment s'étendre aux variétés de toutes les espèces (cf. *Colocasia antiquorum* et *Artocarpus*).

3.2. — *Formes et tailles des grains d'amidon*

Elles sont très variables, quoique caractéristiques pour chaque amidon. Cependant, des analogies de formes, auxquelles sont associées des similitudes de tailles, permettent de rassembler en trois groupes tous les amidons examinés (tabl. 4). En effet, certains sont surtout constitués de grains ovoïdaux, d'autres de grains polygonaux, d'autres de grains sphériques ou hémisphériques.

Les grains du premier groupe sont relativement gros, leur plus grande dimension étant le plus souvent de 40 μm et leur plus petite de 24 μm. Ceux du second groupe sont toujours très petits, avec un « diamètre » moyen généralement compris entre 1 et 5 μm, tandis que ceux du troisième groupe ont un « diamètre » moyen notablement plus grand, très souvent de l'ordre de 10 μm, mais rarement supérieur à 20 μm.

Les amidons de *D. rotundata*, variété « ogoja », *D. dumetorum*, variété hirsute à chair jaune, et *Artocarpus communis*, variété « seminifera », peuvent être considérés

TABLEAU 4

Formes, tailles et spectres de diffraction des grains d'amidon

Origine de l'amidon	Forme des grains	Longueur (µm)	Diamètre (µm)	Type du spectre
D. alata	ovoïdale	20 *30*(*) 55	10 *22*(*) 40	B
D. bulbifera		15 *31* 55	10 *24* 40	B
D. libreschiana		20 *39* 80	15 *31* 70	B
D. schimperiana		20 *38* 60	10 *23* 35	B
D. rotundata ogoja		15 *24* 60	5 *18* 30	B
D. rotundata conique		20 *39* 60	10 *28* 40	B
D. cayenensis long		15 *34* 60	10 *21* 40	B
D. cayenensis digité		70 *41* 90	10 *24* 40	B
D. esculenta	polygonale		1 — 10	Cb
D. dumetorum (toutes variétés)			1 — 5	Ca
Coloc. antiq. blanc			1 — 10	A
Coloc. antiq. rouge			1 — 5	A
Coloc. antiq. ex-Bafut			1 — 4	A
Pachyrrhizus erosus	sphérique ou 1/2 sphérique		2 — 12	A
Manihot esculenta (rouge et blanc)			4 — 40	Ca
Coleus esculentus			5 — 12	Ca
Xanthosoma sagittifolium (rouge et blanc)			5 — 20	Ca
Artoc. integra			3 — 12	Ca
Artoc. com. apyrena			2 — 12	B
Artoc. com. seminifera			3 — 15	B
Ipomoea batatas (toutes variétés)			4 — 40	Ca

(*) Dimensions les plus fréquentes.

comme respectivement représentatifs, au point de vue formes et tailles, de chacun de ces groupes. La microscopie en lumière blanche, au même agrandissement, met particulièrement bien en évidence les différences de tailles des trois types de grains (fig. 1*a*, 2*a*, 3*a*); en lumière polarisée, elle montre que les grains ovoïdaux présentent une croix noire excentrée (fig. 1*b*), alors qu'elle apparaît centrée dans le cas des grains polygonaux et sphériques (fig. 2*b* et 3*b*). Quant aux formes des grains, c'est par microscopie électronique à balayage, avec grandissements convenables, qu'elles sont le mieux précisées (fig. 1*c*, 2*c*, 3*c*).

En même temps qu'il fait apparaître une certaine corrélation entre les formes et les tailles des grains d'amidon, le classement effectué montre que ces caractères morphologiques peuvent être très différents pour des amidons issus d'espèces végétales d'un même genre (cf. *D. rotundata* et *D. dumetorum*), alors qu'ils restent analogues lorsqu'il s'agit de variétés d'une même espèce (cf. variétés de *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *Colocasia antiquorum*, *Artocarpus communis*, *Ipomoea batatas*).

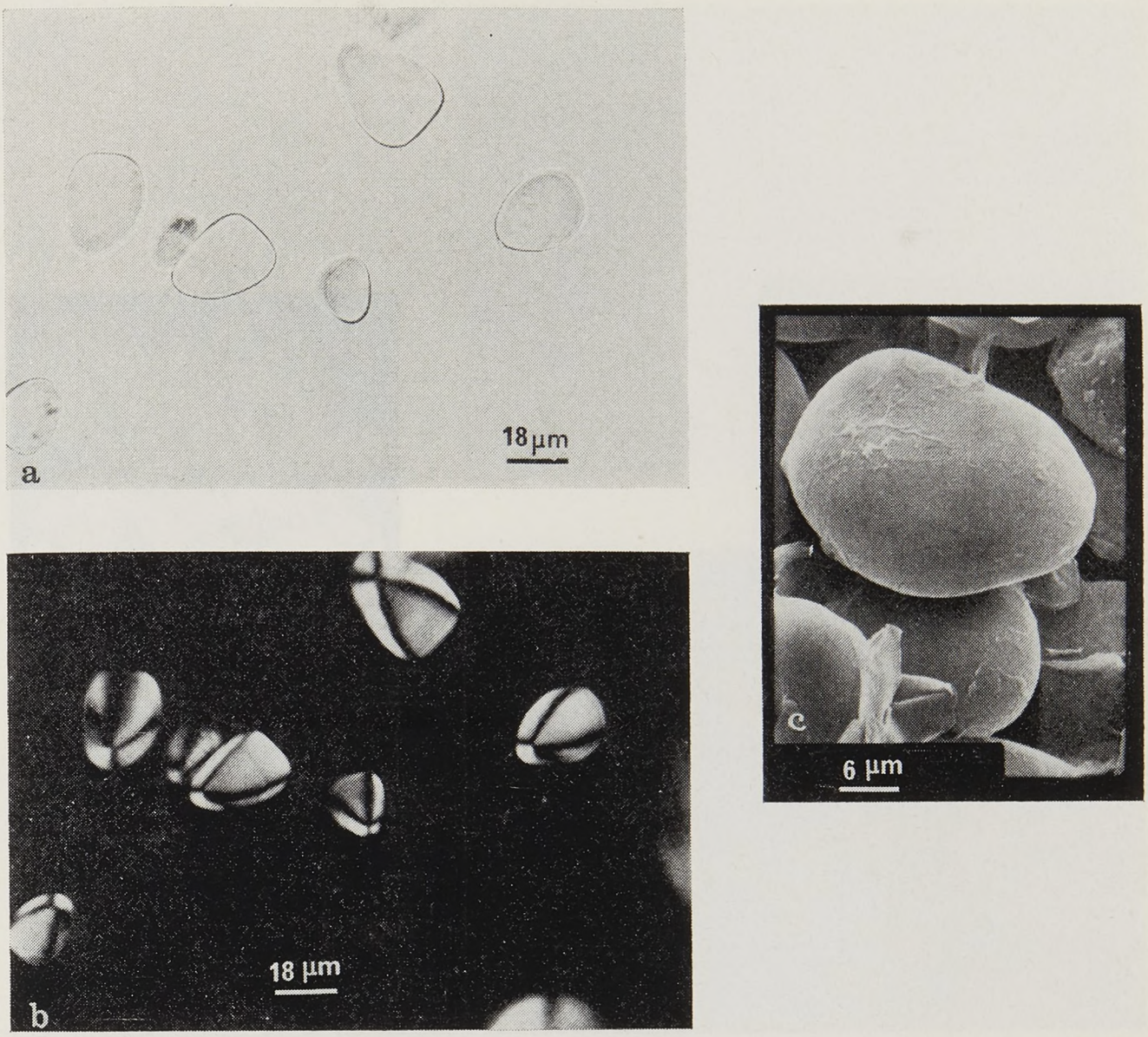


FIG. 1. — *Grains d'amidon de* D. rotundata « *ogoja* ».

a) microscopie en lumière blanche, G × 500.
b) microscopie en lumière polarisée, G × 500.
c) microscopie électronique à balayage, G × 1500.

D'autre part, la similitude des formes et des tailles des grains d'amidon des diverses variétés de l'igname *D. dumetorum* — cultivées en des lieux très différents (YAOUNDE et BAMBUI) — et le bon accord entre nos résultats et ceux obtenus au GHANA (RASPER et COURSEY, 1967) incitent à considérer que les caractères morphologiques des grains ne sont pas influencés par la localisation géographique des lieux de croissance des végétaux.

3.3. — *Spectres de diffraction de rayons X*

Il est bien connu que le spectre de diffraction de grains d'amidon indique qu'une partie de leur structure est régulièrement organisée. L'organisation n'est cependant pas la même pour tous les amidons puisqu'ils ne donnent pas tous le même spectre. Habituellement, ils sont classés en trois groupes principaux définis chacun par un

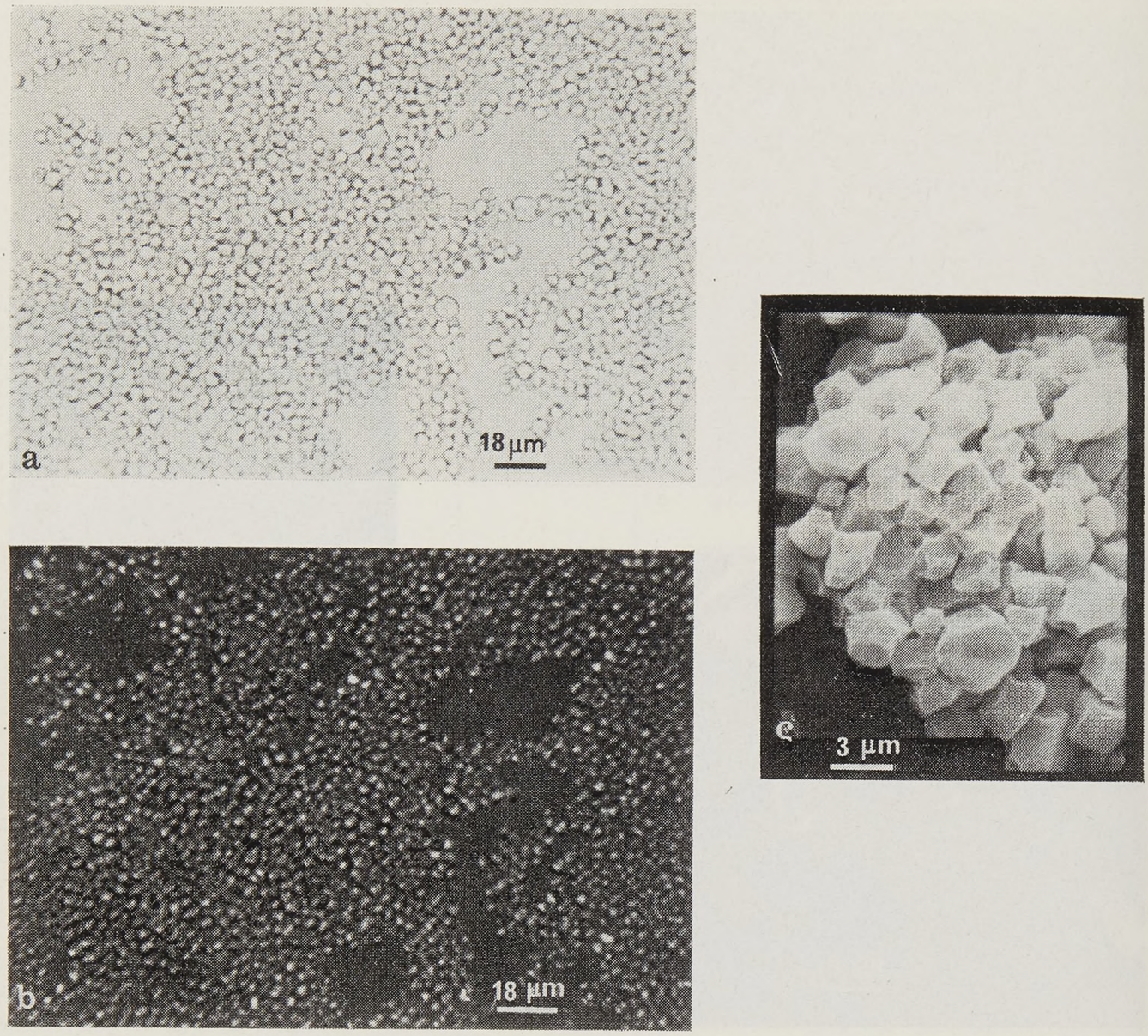


FIG. 2. — *Grains d'amidon de* D. dumetorum *hirsute jaune.*

a) microscopie en lumière blanche. G × 500.
b) microscopie en lumière polarisée, G × 500.
c) microscopie électronique à balayage, G × 3000.

spectre particulier désigné par A, B ou C (KATZ et van ITALLIE, 1930). Les spectres A et B sont considérés comme purs, c'est à dire dus, chacun, à une phase cristalline particulière et homogène. Par contre, le spectre C serait une composition des deux précédents, consécutive à la présence simultanée des deux phases dans chacun des grains de l'amidon concerné. Des proportions variables de ces phases seraient la cause d'analogies plus ou moins marquées entre un spectre C et les spectres A ou B, d'où les désignations Ca, Cb, Cc parfois employées (ROSENTHAL *et al.*, 1974).

Cependant, les résultats d'une étude radiocristallographique de divers amidons lintnérisés (DUPRAT *et al.*, 1974) conduisent à considérer que seul le spectre B est pur. Il est en effet apparu que les résidus non hydrosolubles produits par hydrolyse acide d'un amidon à spectre B donnent encore ce spectre, même lorsqu'ils ne représentent plus que 10 p. 100 de la masse initiale d'amidon. Ce résultat est tout à fait compatible avec le concept de l'homogénéité de la structure cristalline d'un amidon à spectre B. Il n'en va pas de même avec les résidus issus d'amidons à spectre A ou

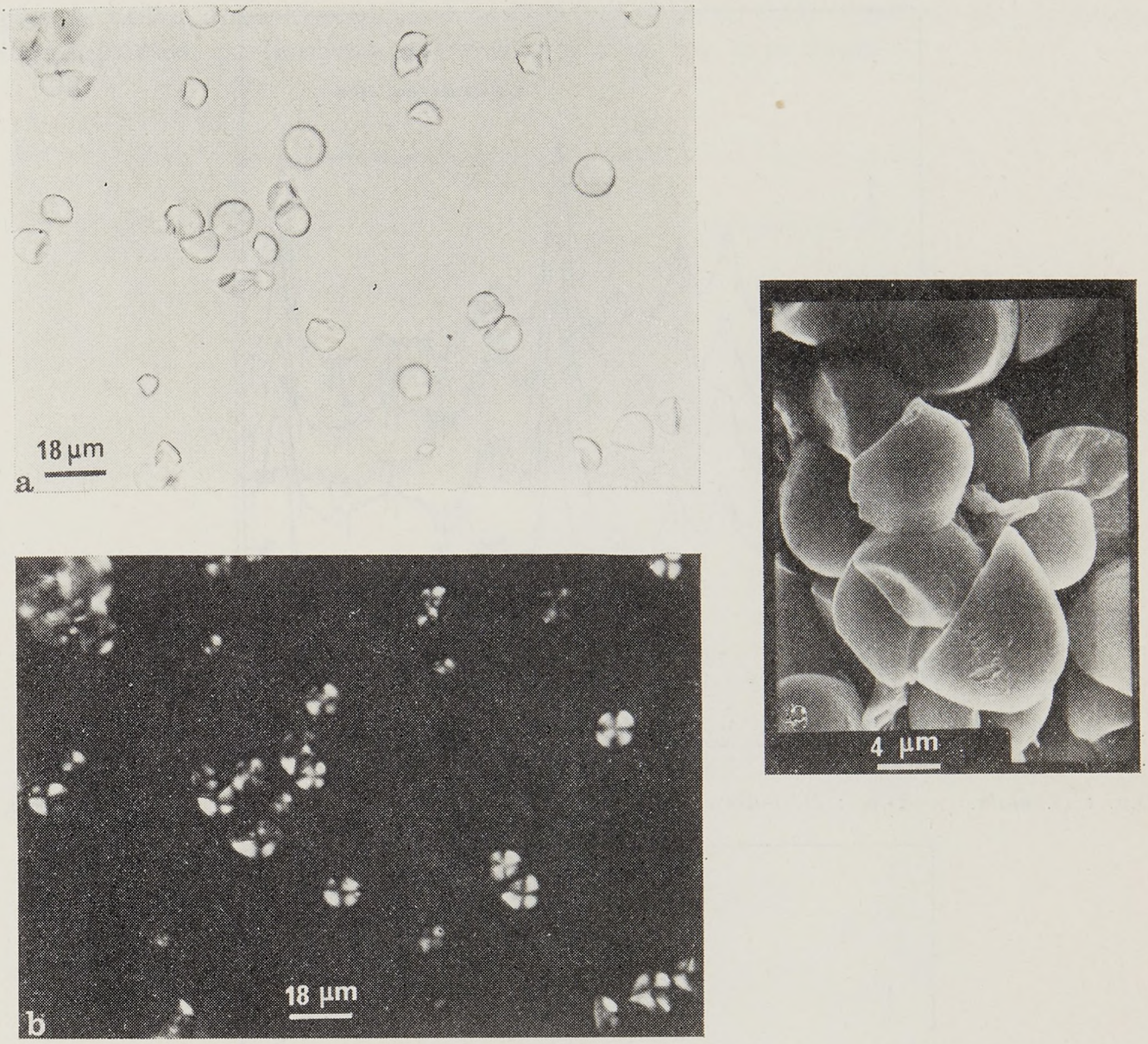


FIG. 3. — *Grains d'amidon de* Artocarpus communis « *seminifera* »
a) microscopie en lumière blanche, G × 500.
b) microscopie en lumière polarisée, G × 500.
c) microscopie électronique à balayage, G × 2250.

C, leurs spectres se différencient notablement des spectres primitifs, qui ne se rapporteraient donc pas à des structures homogènes.

Sur la base de ces considérations, les amidons peuvent être séparés en deux catégories seulement, suivant que leurs spectres possèdent les caractéristiques du spectre B pur ou celles des spectres A, Ca, Cb, Cc. Les spectres des amidons examinés ici (fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9) montrent que tous ceux à gros grains, donc la plupart des amidons de *Dioscorea*, se rangent dans la catégorie caractérisée par le spectre B, qui comprend cependant aussi les amidons à petits grains des deux variétés d'*Artocarpus communis* (tabl. 4). Les autres amidons, tous de dimensions inférieures à 20 µm, se rangent dans la seconde catégorie. Ainsi, sans avoir valeur de critère absolu du type d'organisation cristalline d'un amidon, une grande taille de grains laisse présumer une structure à spectre B, c'est-à-dire du même type que celle de l'amidon de pomme de terre. Dans la mesure où l'organisation cristalline d'un amidon peut être en rapport avec ses propriétés physiques et chimiques, les analo-

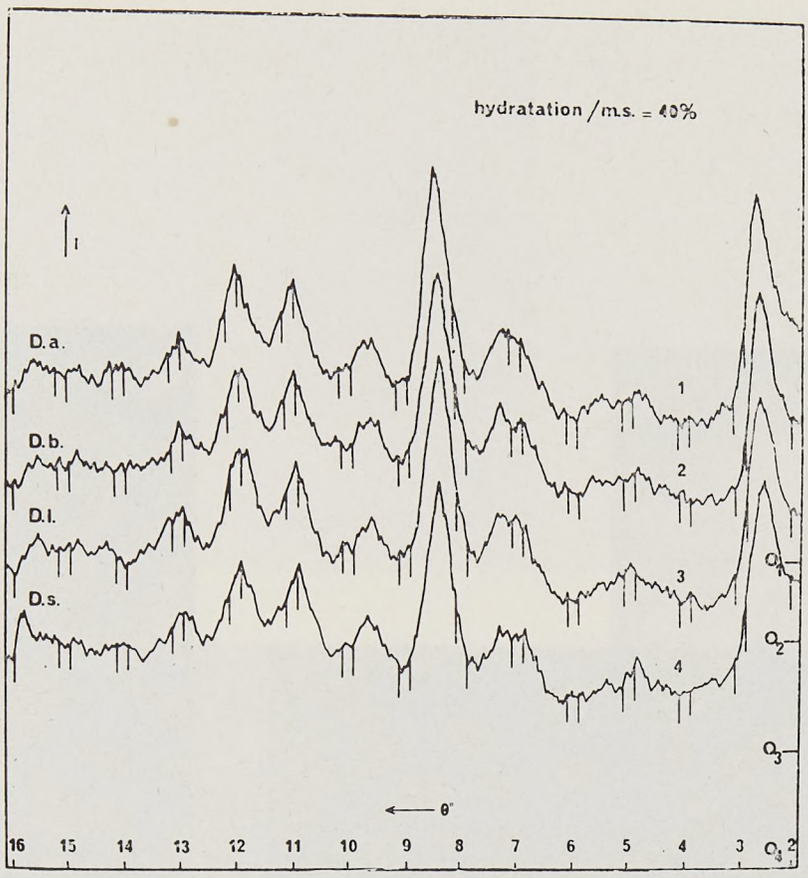


FIG. 4.

D.a. : *D. alata.* D.b. : *D. bulbifera.* D.l. : *D. libreschiana.* D.s. : *D. schimperiana.*

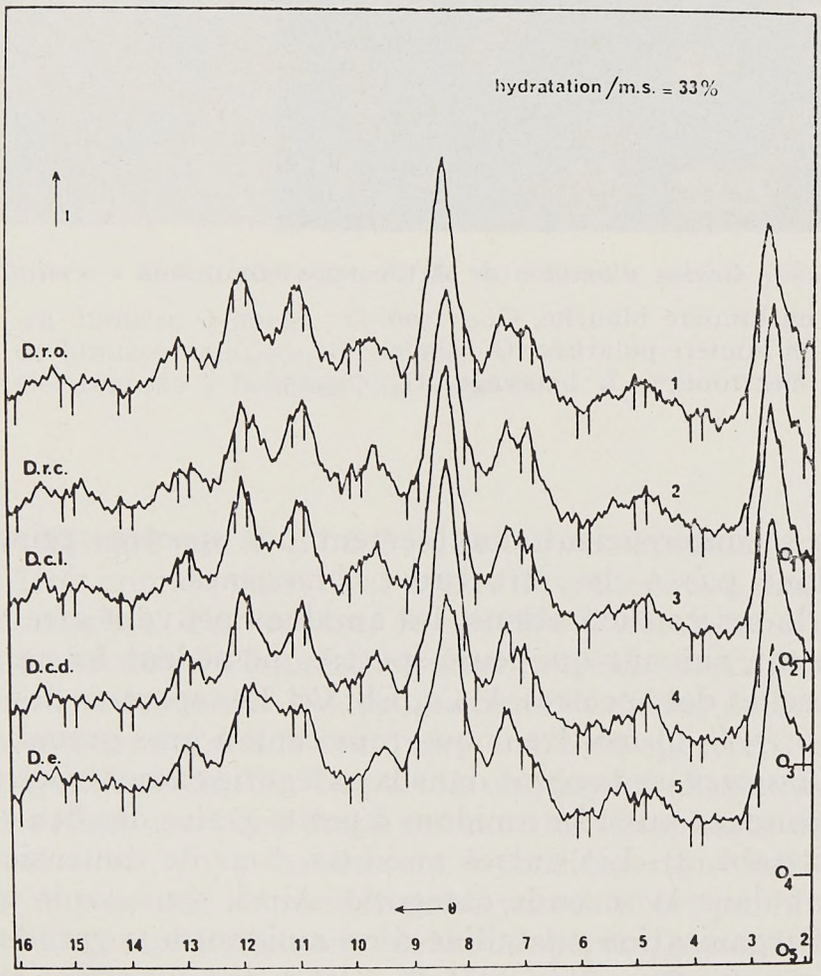


FIG. 5. — D.r.o. : *D. rotundata* « ogoja ».

D.r.c. : *D. rotundata* conique. D.c.d. : *D. cayenensis* digité.

D.c.l. : *D. cayenensis* long. D.e. : *D. esculenta.*

gies de tailles apparaissent ainsi susceptibles d'avoir pour corollaire des analogies de propriétés, particulièrement lorsqu'il s'agit de gros grains.

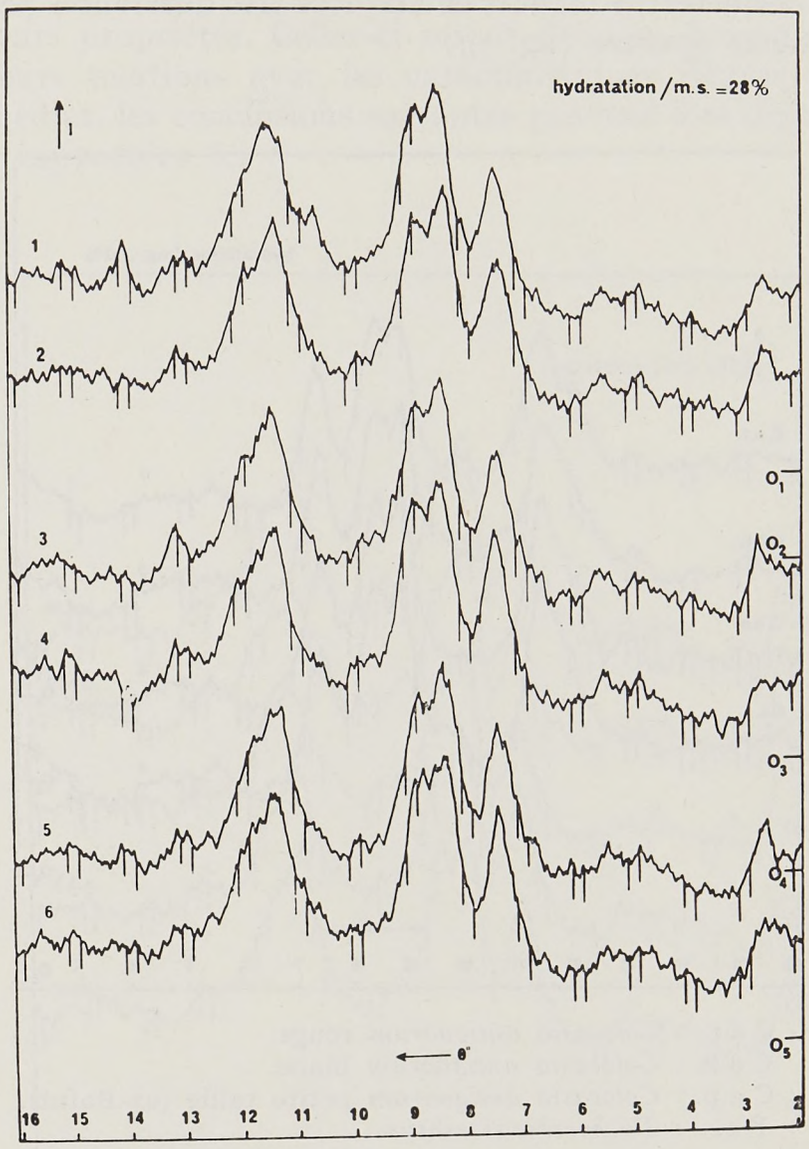


FIG. 6. — *D. dumetorum* : 1 : hirsute jaune, BAMBUI 1970.
2 : hirsute jaune, YAOUNDE 1971.
3 : lisse jaune, BAMBUI 1970.
4 : lisse jaune, BAMBUI 1971.
5 : lisse blanc, BAMBUI 1970.
6 : lisse blanc, YAOUNDE 1971.

La comparaison des divers spectres conduit encore aux remarques suivantes :

a) de toute évidence, le spectre A n'est pas spécifique des amidons de céréales, ceux de tubercules ou de racines donnant aussi ce spectre (fig. 7 : *Colocasia antiquorum*) ou un spectre extrêmement voisin (fig. 6 : *D. dumetorum*; fig. 8 : *Xanthosoma sagittifolium*); de même, le spectre B n'est pas spécifique de l'amidon de tubercules puisqu'il apparaît également avec celui des graines d'*Artocarpus communis* « seminifera » ou de la pulpe d'*Artocarpus communis* « apyrena » (fig. 9), ou encore avec celui des caryopses d'amylomaïs (CHARBONNIERE *et al.*, 1968);

b) le spectre d'un amidon n'est pas en relation directe avec sa teneur en amylose : des amidons issus de végétaux d'un même genre (*Artocarpus integra* et *Artocarpus communis* « seminifera », à teneurs en amylose très voisines (22,7 et 21,8 p. 100) donnent des spectres différents, alors que ceux issus des deux variétés d'*Artocarpus communis*, à teneurs en amylose très différentes (21,8 et 9,2 p. 100), donnent le même spectre (fig. 9);

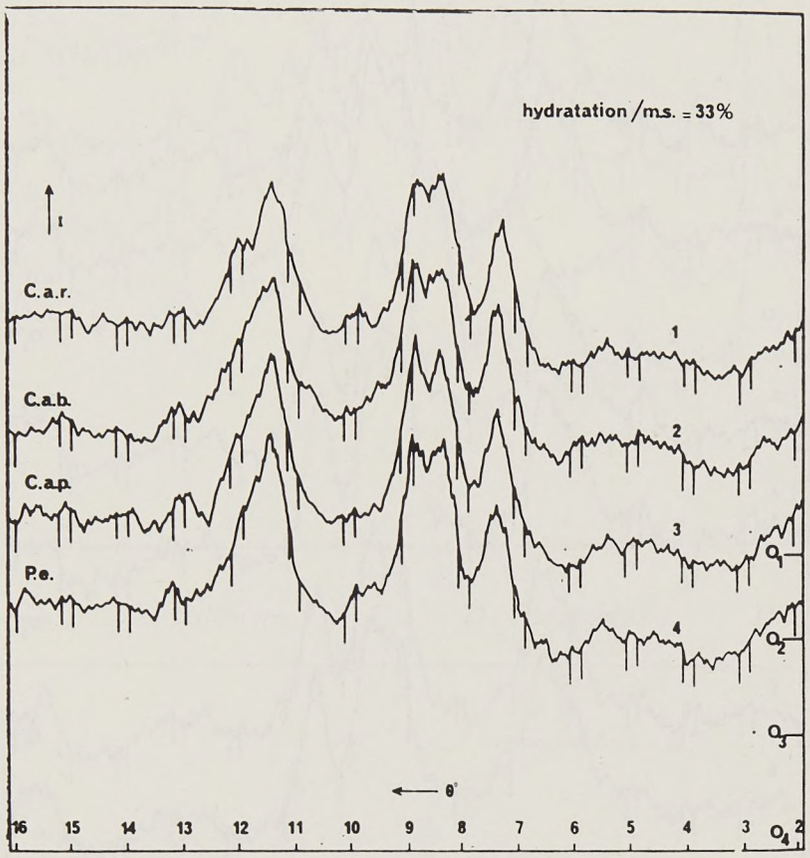


FIG. 7. — C.a.r. : *Colocasia antiquorum* rouge.
C.a.b. : *Colocasia antiquorum* blanc.
C.a.p. : *Colocasia antiquorum* petite taille (ex-Bafut).
P.e. : *Pachyrrhizus erosus*.

c) les amidons d'espèces d'un même genre n'ont pas tous la même structure : dans le genre *Dioscorea*, l'amidon de *D. dumetorum* est à spectre Ca (fig. 6), alors que les amidons des autres espèces sont à spectre B (fig. 4 et 5); dans le genre *Artocarpus*, l'amidon de *A. integra* est à spectre Ca et celui de *A. communis* à spectre B (fig. 9);

d) les amidons de variétés d'une espèce ont tous la même structure, tels ceux des variétés de diverses espèces de *Dioscorea* (fig. 5 et 6) ou de variétés d'*Artocarpus communis* et d'*Ipomoea batatas* (fig. 9), *Colocasia antiquorum* (fig. 7), *Manihot esculenta* et *Xanthosoma sagittifolium* (fig. 8);

e) l'identité des spectres des amidons de toutes les variétés considérées de *D. dumetorum* (fig. 6) indique que le type de l'organisation cristalline des grains est indépendant de la localisation des lieux de croissance des végétaux et de l'année de récolte, comme leur teneur en amylose (cf. § 3.1.) et leur morphologie (cf. § 3.2).

IV. — Conclusions

Le présent mémoire n'expose qu'une partie des résultats de notre étude puisqu'il concerne seulement des caractéristiques des amidons considérés et ne traite pas de leurs propriétés. Celles-ci seront décrites dans une seconde partie qui précisera leurs relations avec les caractéristiques déterminées.

Dans l'immédiat, les conclusions suivantes peuvent être dégagées des données expérimentales rapportées ici :

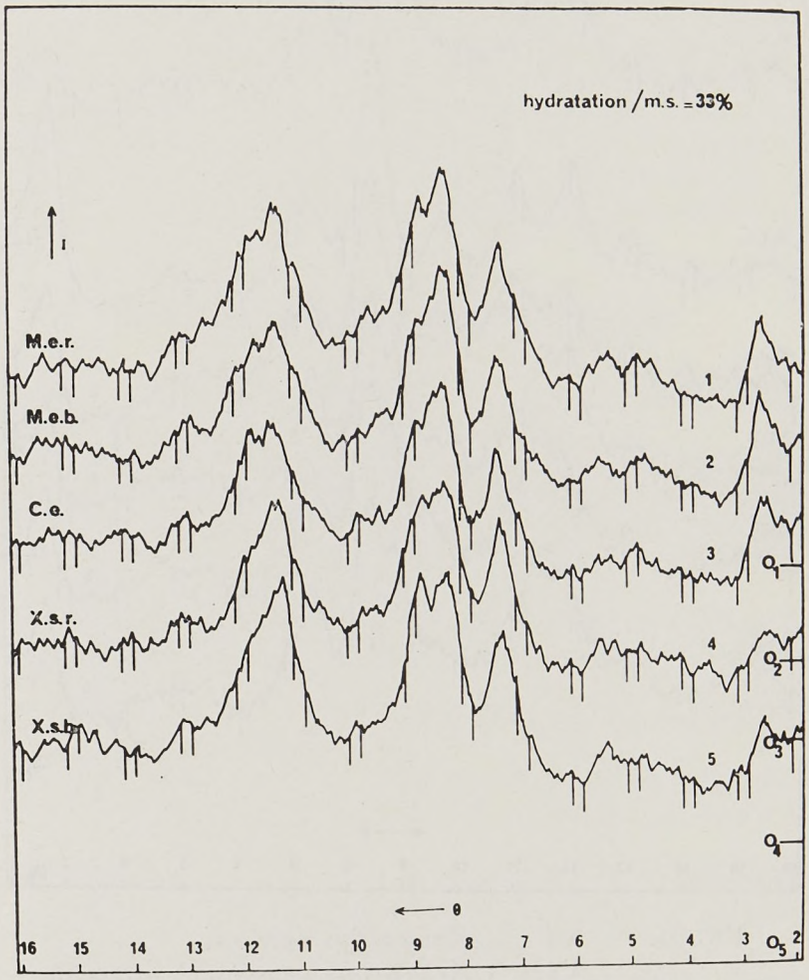


FIG. 8. — M.e.r. : *Manihot esculenta* rouge.
M.e.b. : *Manihot esculenta* blanc.
C.e. : *Coleus esculentus*.
X.s.r. : *Xanthosoma sagittifolium* rouge.
X.s.b. : *Xanthosoma sagittifolium* blanc.

a) la détermination de la taille des grains d'un amidon, par simple examen au microscope, peut permettre de présumer du type de leur organisation cristalline, surtout s'il s'agit de gros grains, et de le rapprocher d'amidons de propriétés connues;

b) les amidons de variétés d'une même espèce végétale ont la même organisation cristalline et sont par conséquent susceptibles de posséder des propriétés de digestibilité comparables;

c) la teneur en amylose d'un amidon n'étant pas caractéristique de l'espèce dont il provient, certaines propriétés des amidons de variétés d'une même espèce pourront être différentes, en particulier celles relatives à la rhéologie de milieux à base d'amidon ou comportant de l'amidon;

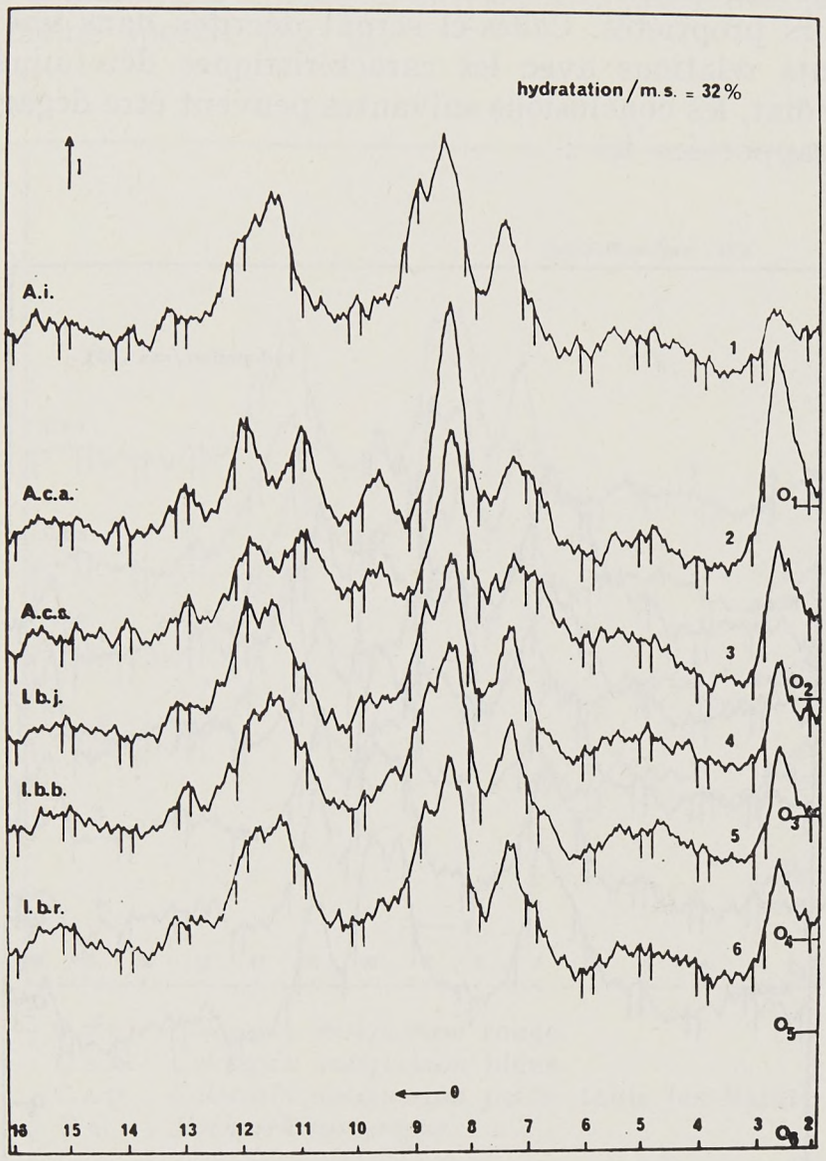


FIG. 9. — A.i. : *Artocarpus integra.*
A.c.a. : *Artocarpus communis* apyrena.
A.c.s. : *Artocarpus communis* seminifera.
I.b.j. : *Ipomoea batatas* jaune.
I.b.b. : *Ipomoea batatas* blanche.
I.b.r. : *Ipomoea batatas* rouge.

d) la teneur en amylose, la morphologie et l'organisation cristalline du grain d'amidon ne sont pas influencées par la localisation du lieu de provenance du végétal.

Reçu pour publication en juin 1978.

Remerciements

Nous remercions vivement Monsieur D. GALLANT, du Laboratoire de microscopie du Centre de Recherches Agro-Alimentaires (I. N.R.A. Nantes), pour les examens de microscopie optique et électronique qu'il a effectués.

Summary

Characteristics of starches from tropical food plants

The starch potential resource constituted by numerous tropical plants is very important, but enlargement of the utilizations of their starches involves a better knowledge of the characteristics of these ones. Thirty starches from tropical plants of various genus, species and varieties were studied. Their chemical composition, amylose content, form, size and crystalline organization type are reported and compared.

The amylose contents of starch granules from varieties of same species are often closely related, but large differences are also observed between varieties of some species. No relationship appears between the crystalline organization type of the starch granules and their amylose content, whereas, without being an absolute criterion, their dominant medium size can let presume that type: B for starches with granules of size over 30 µm, A or C for most of the starches with smaller granules. The crystalline organization type is the same for starches from varieties of a same species, but can be the same or not for species of a same genus. Neither the localization of the culture grounds of plants, nor the harvest year have an effect upon the amylose content, the morphology or the crystalline organization type of the starch granules.

Références bibliographiques

ABD-ALLAH M. A., FODA Y. H., HAMED M.G.E., 1974. Characteristics and « fodal » — factor of mango seed kernel starch. *Die Stärke*, **26** (12), 426-433.

AUMAITRE A., CORRING T., LE DIVIDICH J., 1969. Étude de la vitesse d'hydrolyse *in vitro* de quelques amidons de plantes tropicales (patate douce, banane, igname) par le suc pancréatique de porcelet; relation entre la vitesse de dégradation *in vitro* et la digestibilité apparente de la ration. *J. Rech. Porcine en France*, 99-103, I.N.R.A.-I.T.P. éd., Paris.

Annuaire FAO de la Production, 1975, **29**, 80-87.

BEMILLER J. N., 1964. *Iodimetric determination of amylose. Amperometric titration.* In WHISTLER R. L., *Methods in carbohydrate chemistry*, Starch, vol. IV, 165-168, Academic Press Inc., New-York-London.

BERRIOS M. L., GONZALEZ M. A., 1971. Extraction, purification and amylose content of some starches. *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, **55**, 263-264.

BRENNAN J. G., SODAH-AYERNOR G., 1973. A study of the kinetics of retrogradation in a starch-based dough made from dehydrated yam (*Dioscorea rotundata* L. Poir). *Die Stärke*, **25** (8), 276-280.

CERNING-BEROARD J., LE DIVIDICH J., 1976. Valeur alimentaire de quelques produits amylacés d'origine tropicale : étude *in vitro* et *in vivo* de la patate douce, de l'igname, du malanga, du fruit à pain et de la banane. *Ann. Zootech.*, **25** (2), 155-168.

CHARBONNIÈRE R., MERCIER C., TOLLIER M.-Th., GUILBOT A., 1968. Étude diffractométrique des amidons de maïs à teneur variable en amylose. *Die Stärke*, **20** (3), 75-78.

CORRÉA A. M. N., NAKAMURA T., TOLMASQUIM E., 1970. Estudo das propriedades do amilo de fruta-pao (*Artocarpus incisa* L.). *Revista Brasileira de Technologia*, **1**, 27-31.

COURSEY D. G., HAYNES P. H., 1970. Root crops and their potential as food in the tropics. *World Crops*, July/August, 261-265.

DEATHERAGE W. L., Mac MASTERS M. M., VINEYARD M. L., BEAR R. P., 1954. A note on starch of high amylose content from corn with high starch content. *Cereal Chem.*, **31**, 50-52.

DEATHERAGE W. L., Mac MASTERS M. M., RIST C. E., 1955. A partial survey of amylose content in starch from domestic and foreign varieties of corn, wheat, and sorghum and from some other starch-bearing plants. *Trans.* A.O.C.C., **13** (1), 31-42.

DIMLER R. J., 1964. *Determination of optical rotation for determination of concentration of starch content of corn.* In WHISTLER R. L., *Methods in carbohydrate chemistry*, Starch, vol. IV, 133-139, Academic Press Inc., New-York-London.

DUPRAT F., CHARBONNIÈRE R., ROBIN J.-P., GUILBOT A., 1974. Radiokristallographische studien an lintnerisierten stärken. *Zezsyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych, Z.*, **159**, 155-164.

FAVIER J.-C., 1969. Étude de la digestibilité *in vitro* de l'amidon de diverses plantes alimentaires du Sud-Cameroun. Influence des transformations technologiques sur l'amidon de manioc. *Ind. alim. agr.*, **86**, 9-13.

GUILLEMET R., JACQUOT R., 1943. Essai de détermination de l'indigestible glucidique. *C. R. Acad. Sci.*, **216**, 508-510.

HIGASHIHARA M., UMEKI K., YAMAMOTO T., 1975. Isolation and some properties of taro root starch. *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **22** (Part 3), 61-65.

HOLLÓ J., GUILBOT A., 1964. *L'utilisation industrielle de l'igname et les caractéristiques de son amidon.* In « *Premier Congrès Int. des Ind. Agric. et Alim. en zones tropicales et subtropicales* », *Abidjan (Côte d'Ivoire)*, **1**, 537-560, C.I.I.A., B.I.P.C.A., S.E.D.I.A.C., Paris.

KATZ J. R., Van ITALLIE Th. B., 1930. Alle Stärkearten haben das gleiche Retrogradationspektrum. *Z. phys. Chem.* A **150**, 90-99.

LE DIVIDICH J., 1977. Feeding Value of *Canna edulis* Roots for Pigs. *J. Agric. Univ.* P. R., **61** (3), 267-274.

Mac MASTERS M. M., 1964. *Microscopic technics for determining starch granule properties.* In WHISTLER R. L., *Methods in carbohydrate chemistry*, Starch, vol. IV, 233-240, Academic Press Inc., New-York-London.

MARTIN F. W., THOMPSON A. E., 1971. Crude protein content of yams. *Hort Science*, **6** (6), 545-546.

MIÈGE J., 1948. Le *Dioscorea esculenta* Burkill en Côte d'Ivoire. *Rev. Int. Bot. appl. Agric. Trop.*, **28**, 509-514.

MIÈGE J., 1957. Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées. *J. Agric. Trop. Bot. appl.*, **t. IV** (7-8), 315-342.

RAO B. S., MURTHY A. R. V., SUBRAHMANYA R. S., 1952. The amylose and the amylopectin contents of rice and their influence on the cooking quality of the cereal. *Proc. Indian Acad. Sci., Sect.* **B**, 36, 70-80.

RAO P. S., BERI R. M., 1952. Starch from the tubers of *Dioscorea hispida* Dennst. *Sci Cult.*, **17** (11), 482-483.

RAO P. S., BERI R. M., 1955. Dioscorea starches. *Sci. Cult.*, **20** (8), 397-399.

RASPER V., COURSEY D. G., 1967. Properties of starches of some west african yams. *J. Sci. Fd Agric.*, **18**, 240-244.

RASPER V., 1969. Investigations on starches from major starch crops grown in Ghana. I. Hot paste viscosity and gel-forming power. *J. Sci. Fd Agric.*, **20**, 165-171.

RASPER V., 1969. Investigations on starches from major starch crops grown in Ghana. II. Swelling and solubility patterns: amyloelastic susceptibility. *J. Sci. Fd Agric.*, **20**, 642-646.

RASPER V., 1971. Investigations on starches from major starch crops grown in Ghana. III. Particle size and particle size distribution *J. Sci. Fd Agric.*, **22**, 572-580.

ROSENTHAL F. R. T., ESPINOLA L., 1969. The Mucuna (*Dioclea Malocarpa*). The properties of the starch. *Die Stärke*, **21** (10), 262-266.

ROSENTHAL F. R. T., ESPINOLA S., OLIVEIRA S. M. G., 1970. Jack-bean starch, 1. Properties of the granules and of the pastes. *Die Stärke*, **22** (4), 126-129.

ROSENTHAL F. R.T ., ESPINOLA L., SERAPIAO M. I. S., SILVA S. M. O., 1971. Lablab bean starch. I. Properties of its granules and pastes. *Die Stärke*, **23** (1), 18-23.

ROSENTHAL F. R. T., PELEGRINO S. L., CORRÉA A. M., 1972. Studies on the starches of Dioscorea. *D. alata*, eatable and *D. cinnamomifolia*, non eatable. *Die Stärke*, **24** (2), 54-58.

ROSENTHAL F. R.T ., NAKAMURA T., 1972. Studies on the structure of leguminosae starches. 1. Solubility in dimethyl sulfoxide and by enzymatic action. *Die Stärke*, **24** (5), 152-158.

ROSENTHAL F. R.T ., NAKAMURA T., ESPINOLA A. M. C., JOCHIMEK M. R., 1974. Structure of starch granules. Part 3. Some considerations on Leguminosae and Tuberosae. *Die Stärke*, **26** (2), 50-56.

ROSENTHAL F. R.T ., PELEGRINO S. L., MELLO A. P., SILVA S. M. O., 1974. Studies on the starch of *Dioclea violacea*. *Die Stärke*, **26** (7), 243-248.

SRIVASTAVA H. C., HARSHE S. N., GHARIA M. M., MUDIA G. P., 1970. Physicochemical studies on some starches. *Die Stärke*, **22** (5), 162-166.

WOLFF I. A., DAVIS H. A., CLUSKEY J. E., GUNDRUM L. J., RIST C. E., 1951. Preparation of films from amylose. *Ind. Eng. Chem.*, **43**, 915-919.

Ann. Technol. Agric., 1978, **27** (4), 827-835

Influence du cépage et du milieu sur la composition phénolique de cinq raisins noirs

J. BISSON* et P. RIBÉREAU-GAYON**

* *Institut National de la Recherche Agronomique*
Domaine d'Expérimentation viticole, 58200 Cosne-Cours-sur-Loire.

** *Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II, 33405 Talence*

Résumé

La composition phénolique des raisins noirs est une caractéristique variétale. Les conditions de milieu influent sur la teneur en anthocyanes et en tanins mais les observations de 1977 montrent que chaque cépage possède des caractéristiques propres qui se maintiennent quel que soit le lieu où il est cultivé.

Mots clés : *raisin, polyphénols, variétés, milieux.*

Introduction

Les cépages noirs du quart nord-est de la France ne fournissent pas des vins rouges régulièrement pourvus en composés phénoliques responsables de la couleur, d'une grande partie des qualités gustatives et des aptitudes à la conservation.

La connaissance de ces substances et les méthodes d'analyse dues essentiellement aux recherches de RIBÉREAU-GAYON (1971, 1972) permettent de réaliser des études comparatives sur la composition des différentes variétés. Les résultats obtenus déterminent la valeur technologique du raisin des divers cépages et conditionnent leur utilisation en vinification.

Le présent travail a porté essentiellement sur la teneur en anthocyanes et en tanins des pellicules et des pépins de la baie des raisins de cinq cépages et sur les possibilités de passage théorique de ces constituants dans le moût et le vin au cours de la macération.

Les difficultés d'une telle étude ont déjà été signalées (RIBÉREAU-GAYON, 1971) au cours d'une publication dont ce travail s'est inspiré.

L'expérimentation effectuée en 1977, au moment de la maturité, a porté sur deux séries de cinq cépages rouges : le Cabernet franc, le Cot, le Gamay à jus blanc,

le Merlot et le Pinot noir; ils provenaient de deux régions différentes : le littoral méditerranéen sur vignes franches de pied (Marseillan-Plage, Hérault) et la moyenne vallée de la Loire, sur vignes greffées (Cosne-sur-Loire, Nièvre).

Méthodes expérimentales

Bien qu'aucune étude systématique et statistique n'ait jamais été faite jusqu'ici en ce domaine, chaque prélèvement comprend 100 baies à maturité technologique, sans pédicelle, prises au hasard sur un clone, c'est à-dire sur un nombre de ceps limité (5 à Marseillan, 6 à Cosne). Dans les deux cas, le clone de Gamay est strictement le même. Après pesée, les pellicules et les pépins sont soigneusement séparés à la main dans chaque lot. Les résultats numériques et pondéraux sont réunis dans le tableau 1.

L'extraction des composés phénoliques est réalisée à l'aide de la solution préconisée par RIBÉREAU-GAYON, 1971, à savoir : un solvant à 15° alcooliques et de pH = 2,45 (alcool : 3 l; acide tartrique à 100 g/l : 1 l; NaOH 10 N : 20 ml; eau distillée : 16 l).

Avec cette solution, chaque échantillon de pellicules fait l'objet des cinq extractions successives suivantes :

1) à froid sans agitation, dans 150 ml durant 144 h
2) à froid avec agitation, dans 450 ml durant 15 h
3) à froid sans agitation, dans 450 ml durant 24 h
4 et 5) à chaud sans agitation, dans 450 ml jusqu'à 100 °C et refroidissement spontané.

Les échantillons de pépins sont traités selon le même programme mais, à chaque stade, dans 150 ml de solution seulement.

Par rapport au travail de référence, les seules variantes résident : 1) dans le premier stade qui fait appel, pour les pellicules, à 150 ml de solution, volume plus voisin de celui du jus extrait de 100 baies; 2) dans la durée de macération (144 h) qui tend à reproduire une cuvaison optimale courante dans la région Centre. La quantité d'anthocyanes et de tanins qui peut passer théoriquement dans le vin rouge au cours d'une cuvaison de six jours est ainsi évaluée.

Il est indispensable de rappeler que l'on peut considérer l'extraction des anthocyanes comme à peu près complète après traitement des pellicules mais qu'il n'en est pas de même avec les tanins, surtout ceux fournis par les pépins. AUBERT et POUX, 1969, qui ont étudié divers solvants et durées de macération arrivent aux mêmes conclusions.

Il s'agit d'ailleurs moins ici de connaître la teneur totale absolue en anthocyanes et en tanins des raisins que de comparer leurs possibilités de cession de ces composés dans un contexte plus technologique.

Chaque solution d'extraction fait l'objet des déterminations suivantes :

— Phénols totaux par la réaction de Folin-Ciocalteu (RIBÉREAU-GAYON, 1970) exprimés en indice.

— Anthocyanes par décoloration à l'anhydride sulfureux (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1965) exprimées en mg/l et ramenées en g/100 baies.

TABLEAU I

Caractéristiques des raisins à maturité

Cépage	Poids de 100 baies en g	Sucres g/l	Acidité meq/l	Poids 100 pellicules en g	Nombre de pépins	Poids des pépins en g	Poids de la pulpe en g	Jus (ml) (Poids/ pulpe/ densité jus)	Rendement l/Kg
				Marseillan-Plage (Hérault) 14 septembre 1977					
Pinot 19331	129	203	75	20,7	174	7,0	101,3	93	0,72
Gamay 23026	147	201	88	22,0	121	4,0	121,0	111	0,75
Cot 32711	151	178	84	22,7	142	6,1	122,2	113	0,74
Merlot 32602	154	210	69	36,3	148	6,3	111,4	102	0,66
Cabernet franc 32406	114	167	75	21,6	162	7,4	85,0	79	0,69
				Cosne-sur-Loire (Nièvre) 24 octobre 1977					
Pinot 158	138	167	171	21,4	139	7,2	109,4	102	0,74
Gamay 23026	177	161	194	22,5	125	5,2	149,3	139	0,78
Cot 1	186	158	186	29,5	164	7,0	149,5	140	0,75
Merlot 7	137	167	162	21,7	173	7,5	107,8	100	0,73
Cabernet franc 9	131	161	196	15,0	176	8,5	107,5	100	0,76

— Tanins condensés par transformation des leucoanthocyanes en anthocyanes (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966) exprimés en g /l et ramenés en g /100 baies.

La vendange de chaque cépage cultivé dans le Centre a été vinifiée séparément et les vins obtenus ont été suivis de la même manière analytique que les solutions d'extraction.

Discussion des résultats

L'expérimentation se proposait d'apprécier le taux des composés phénoliques des raisins de diverses variétés et de vérifier si le climat, comme on l'admet généralement, influe sur la teneur des baies en anthocyanes et en tanins.

Les résultats regroupés dans le tableau 2 concernent la composition des pellicules et leur intervention au cours des phénomènes de macération; le tableau 3 est relatif aux pépins. Les éléments fournis par les vins figurent dans le tableau 4.

Bien que les conditions de l'expérimentation aient tendu à reproduire les phénomènes qui ont lieu au cours de la vinification, on ne peut pas assurer qu'il en soit absolument ainsi dans la réalité. Le rendement en anthocyanes et en tanins est certainement supérieur au cours des macérations expérimentales pendant lesquelles les pellicules et les pépins sont séparés que durant une vinification qui fait intervenir simultanément toutes les parties solides de la grappe, rafles comprises éventuellement. Les indices de phénols totaux sont très significatifs à cet égard.

Les anthocyanes retrouvées dans les vins des raisins correspondants (tabl. 4) représentent de 28 à 45 p. 100 de celles présentes dans les solutions d'extraction de pellicules macérées à froid durant la même période (144 h). Ces derniers résultats sont calculés en tenant compte du rendement en jus des raisins considérés. Le test de macération à froid des pellicules durant 144 h a permis d'obtenir de 23 à 50 p. 100 des anthocyanes présentes dans les pellicules avec une moyenne de 35 p. 100. Les vinifications séparées réalisées à Cosne en 1977 sur les clones de référence permettent d'établir à 25 p. 100 le pourcentage d'anthocyanes retrouvées réellement dans le vin à partir des concentrations totales extraites des pellicules. Ces chiffres rejoignent ceux qui sont cités dans le travail de référence.

Les deux séries de raisins, prélevés dans le Midi et dans le Centre, donnent un léger avantage à la constitution anthocyanique des 100 baies issues de l'Hérault sans que les résultats soient statistiquement significatifs. Dans les deux cas, les variétés en présence se classent dans le même ordre croissant de teneurs totales en anthocyanes pour 100 baies :

Pinot	0,070 g dans l'Hérault	et 0,080 g dans la Nièvre
Cabernet-franc	0,080 g dans l'Hérault	et 0,080 g dans la Nièvre
Merlot	0,130 g dans l'Hérault	et 0,080 g dans la Nièvre
Gamay	0,140 g dans l'Hérault	et 0,120 g dans la Nièvre
Cot	0,190 g dans l'Hérault	et 0,170 g dans la Nièvre
Moyenne	0,120 g dans l'Hérault	et 0,100 g dans la Nièvre

Seul, le Merlot, présente dans les deux régions un écart de 50 mg d'anthocyanes pour 100 baies mais si l'on rapporte les pigments à 100 g de baies, la différence n'est plus que de 20 mg. Le Merlot, très sensible à la coulure et au millerandage, produit, en effet, des baies de tailles très variables selon les conditions de floraison et l'état de la nouaison (BISSON, 1962).

TABLEAU 2

Teneur des pellicules en composés phénoliques

Cépage	Indice de phénols totaux				Anthocyanes (g dans 100 baies)				Tanins (g dans 100 baies)			
	Extraction :				Extraction :				Extraction :			
	1) 144 h à froid	1, 2, 3) total à froid	4, 5) total à chaud	Total général	1) 144 h à froid	1, 2, 3) total à froid	4, 5) total à chaud	Total général	1) 144 h à froid	1, 2, 3) total à froid	4, 5) total à chaud	Total général
Marseillan-Plage (Hérault) 14 septembre 1977												
Pinot 19331	4,5	6,0	4,4	10,4	0,02	0,05	0,02	0,07	0,06	0,12	0,20	0,32
Gamay 23026 . . .	7,5	10,3	4,3	14,6	0,06	0,11	0,03	0,14	0,04	0,10	0,15	0,25
Cot 32711	12,2	16,3	8,0	24,3	0,08	0,14	0,05	0,19	0,11	0,20	0,36	0,56
Merlot 32602	10,0	13,5	5,7	19,2	0,06	0,10	0,03	0,13	0,11	0,25	0,23	0,48
Cabernet franc 32406	6,5	10,5	3,4	13,9	0,04	0,06	0,02	0,08	0,04	0,12	0,13	0,25
Cosne-sur-Loire (Nièvre) 24 octobre 1977												
Pinot 158	10,4	12,8	4,8	17,3	0,03	0,06	0,02	0,08	0,12	0,17	0,22	0,39
Gamay 23026 . . .	9,0	11,7	4,4	16,1	0,04	0,09	0,03	0,12	0,05	0,07	0,19	0,26
Cot 1	18,6	23,9	8,0	31,9	0,04	0,12	0,05	0,17	0,21	0,34	0,44	0,78
Merlot 7	10,0	12,2	6,1	0,03	0,06	0,02	0,08	0,10	0,14	0,21	0,35	0,35
Cabernet franc 9 . .	9,0	10,7	3,6	14,3	0,03	0,06	0,02	0,08	0,10	0,13	0,19	0,32

TABLEAU 3

Tanins extraits des pépins

Cépage	Indice de phénols totaux				Tanins (g dans 100 baies)			
	Extraction :				Extraction :			
	1) 144 h à froid	1, 2, 3) total à froid	4, 5) total à chaud	Total général	1) 144 h à froid	1, 2, 3) total à froid	4, 5) total à chaud	Total général
	Marseillan-Plage (Hérault) 14 septembre 1977							
Pinot 19331	6,6	1,15	28,8	46,9	0,07	0,11	0,45	0,56
Gamay 23026	6,4	10,0	15,6	32,0	0,07	0,10	0,27	0,37
Cot 32711	7,6	13,9	18,8	40,3	0,09	0,14	0,27	0,41
Merlot 32602	6,7	11,3	18,1	36,1	0,07	0,11	0,20	0,31
Cabernet franc 32406 . . .	4,4	7,6	17,4	29,4	0,04	0,06	0,23	0,29
	Cosne-sur-Loire (Nièvre) 24 octobre 1977							
Pinot 158	10,7	16,0	26,0	52,7	0,12	0,34	0,26	0,60
Gamay 23026	16,4	21,4	19,2	57,0	0,19	0,24	0,28	0,52
Cot 1	8,1	11,6	12,3	32,0	0,14	0,19	0,27	0,46
Merlot 7	10,5	14,2	16,4	41,1	0,16	0,19	0,24	0,43
Cabernet franc 9	7,6	11,0	20,3	38,9	0,10	0,12	0,36	0,48

Compte tenu de l'éloignement des deux vignobles de référence et des variations climatiques nettes, on peut admettre une constitution anthocyanique liée à la nature même du cépage, mais suceptible de fluctuer en fonction du milieu sans que l'effet génotypique ne soit diminué.

TABLEAU 4

Composés phénoliques des vins du Centre après microvinification

cépage	Indice de phénols totaux	Anthocyanes mg /l	Tanins g /l
Pinot 158	30,0	107	1,88
Gamay 23026	24,2	131	1,22
Cot 1	28,3	147	2,08
Merlot 7	19,0	85	0,92
Cabernet-franc 9	25,5	127	1,22

Il existe donc des variétés pauvres en anthocyanes, telles que le Pinot noir et le Cabernet franc et des cépages plus riches en pigments rouges, comme le Cot. Le Gamay et le Merlot occupent une position intermédiaire.

Les tanins, cédés par la pellicule au cours d'une seule macération de six jours à froid, atteignent en moyenne 26 p. 100 de ceux extraits expérimentalement mais qui ne représentent certainement pas la totalité de ceux contenus dans l'enveloppe de la baie (moyenne : 0,09 g pour 100 baies). La quantité libérée au cours d'une période équivalant à celle de la vinification peut représenter un apport d'environ 0,80 g de tanin par litre.

On retrouve en ce domaine des caractéristiques qui paraissent également spécifiques. Les quantités de tanins extraits des pellicules, pour 100 baies, dans les conditions expérimentales classent les cépages des deux régions dans un ordre identique :

Gamay	0,25 g dans l'Hérault et 0,26 g dans la Nièvre
Cabernet franc	0,25 g dans l'Hérault et 0,32 g dans la Nièvre
Pinot	0,32 g dans l'Hérault et 0,39 g dans la Nièvre
Merlot	0,48 g dans l'Hérault et 0,35 g dans la Nièvre
Cot	0,56 g dans l'Hérault et 0,78 g dans la Nièvre

Comme dans le cas des anthocyanes, les écarts constatés dans les teneurs du Merlot et du Cot se réduisent à 40 et 50 mg si l'on rapporte les données à 100 g de baies.

Les pellicules du Gamay et du Cabernet-franc fournissent peu de tanins; celles du Pinot et du Merlot sont mieux pourvues et plus encore celles du Cot.

Les pépins participent à l'enrichissement des vins en tanins avec une intensité comparable à celle des pellicules au cours d'une macération de six jours. Dans ces dernières conditions, 23 p. 100 du total des tanins extraits des pépins, ont été obtenus expérimentalement (moyenne : 0,10 g pour 100 baies).

Théoriquement, les pépins pourraient donc fournir 0,90 g /l de tanins au vin. En cumulant les rôles des pellicules (0,80 g /l), des pépins (0,90 g /l) et des rafles (0,80 g /l obtenus des rafles du Pinot et du Gamay), la teneur théorique en tanins

des vins des cépages étudiés devrait être de 2,50 g/l. Or, la moyenne des teneurs en tanins des vins issus des microvinifications 1977 ne ressort qu'à 1,70 g/l et confirme une observation rapportée plus haut.

Le nombre des pépins, lié à la fécondation des ovules, est très variable selon les années, surtout chez certains cépages (le Merlot, le Cot, le Gamay, par exemple) pour lesquels la floraison est facilement troublée. Le rôle des graines dans les processus d'enrichissement du vin en composés phénoliques ne peut donc pas être envisagé d'une manière précise, une année donnée, exclusivement sous l'angle variétal.

Un fait, surprenant à priori, doit être également signalé et réside dans la richesse moyenne en tanins plus grande des pépins des cépages cultivés dans le Centre par rapport à ceux exploités dans le Midi. Par exemple, l'on trouve respectivement 0,14 g et 0,07 g extraits à froid en 144 h pour 100 baies en moyenne. Dans le premier cas, le net retard de maturité des graines joue peut-être un rôle en facilitant le passage des constituants des pépins, en particulier des leucoanthocyanes, dans le liquide d'extraction à travers des parois incomplètement lignifiées, donc moins compactes. RIBÉREAU-GAYON observait déjà, en 1969, une diminution de la fraction des tanins des pépins extraits à froid de la véraison à la récolte qui pourrait s'expliquer par cette hypothèse.

Conclusions

Le travail tendait à vérifier si les cépages réputés pauvres en composés phénoliques sous des climats peu favorables à la maturation des raisins noirs étaient susceptibles de s'enrichir davantage dans de meilleures conditions de milieu. Les résultats de 1977, qui méritent d'être confirmés, semblent montrer que les cépages pauvres en anthocyanes, malgré un léger gain sous un climat plus favorable, restent dans ces conditions les plus mal pourvus en pigments. Il s'agirait donc bien d'un caractère génétique.

En 1977, la concentration en tanins des pellicules et des pépins serait même plus grande ou ces organes les cèderaient plus facilement, chez les raisins du Centre que chez ceux du Midi.

Les pellicules de certaines variétés sont riches en anthocyanes mais pauvres en tanins (Gamay). D'autres cépages, moins bien pourvus en anthocyanes, fournissent davantage de tanins (Pinot noir et Merlot, par exemple). Enfin, une troisième catégorie présente des pellicules renfermant à la fois des anthocyanes et des tanins abondants (Cot). Ces résultats confirment les observations effectuées à la suite de travaux précédents (BISSON, 1977), notamment en ce qui concerne le Gamay noir à jus blanc et le Pinot noir.

La teneur en composés phénoliques des différentes variétés explique certaines caractéristiques et le comportement des vins issus de ces cépages. Ainsi, les vins de Gamay, bien rouges après la vinification, perdent progressivement leur couleur tandis que l'intensité colorante des produits de Pinot augmente dans un premier stade avec le temps. Dans ce dernier cas, une plus grande richesse en tanins assure aux vins, en général, une meilleure aptitude au vieillissement.

La vocation technologique des cépages est ainsi inscrite dans leur composition phénolique. Le Gamay fournit, en effet, le plus souvent de meilleurs rosés et de meilleurs rouges en primeur que le Pinot qui donne, par contre, des vins rouges plus corsés et de plus longue garde.

Reçu pour publication en juin 1978.

Remerciements

Les auteurs remercient sincèrement MM. TRUEL et RENNE qui ont bien voulu fournir les échantillons de raisins issus des collections du domaine I.N.R.A. de Marseillan (Hérault) ainsi que MM. DUPUY, CORDONNIER et LEGLISE qui ont fait part de leurs judicieuses observations avant la publication de ce travail.

Summary

Variety and environment influences on black grapes phenolic compounds

Phenolic composition of black grapes is a specific character. Environment gives some changes in anthocyanins and tannins values but in different countries each grape variety keeps its phenolic possibilities.

Key words : *grape, polyphenols, varieties, environment.*

Références bibliographiques

AUBERT S. et POUX C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 93-109.

BISSON J., 1962. Monographie du Merlau. *Vignes. Vins*, **111** et **112**, 17-22 et 45-55.

BISSON J., 1977. Orientation technologique de l'amélioration des cépages noirs de cuve. *Com. Symp. intern. Am. Vigne*, Bordeaux, Juin 1977 (sous presse).

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **9**, 2649.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, **48**, 188.

RIBÉREAU-GAYON P., 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Anal.*, **52**, 627.

RIBÉREAU-GAYON P., 1971. Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. I. Expérimentation 1969. *Conn. Vigne Vin*, **5**, 247-261.

RIBÉREAU-GAYON P., 1972. Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. II. Discussion des résultats obtenus en 1969, 1970 et 1971. *Conn. Vigne Vin*, **6**, 161-175.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 837-848,

Effets de traitements technologiques (congélation et appertisation) sur certains constituants de l'arôme des pêches

M. SOUTY et Maryse REICH

Station de Technologie des Produits végétaux
Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A.,
84140 Montfavet

Résumé

Les modifications aromatiques apparaissant dans des pêches appertisées, traitées à l'état frais ou après préstockage par congélation, ont été examinées au niveau des substances les plus lourdes. On constate que ce sont les alcools terpéniques qui subissent le plus de changements et sont les principaux responsables des modifications ou pertes d'arôme remarquées.

Mots clés : *pêches, traitements technologiques, arômes.*

Introduction

En 1973, BAYONOVE a fait le point de nos connaissances sur les constituants volatils de la pêche fraîche. Depuis cette date, cet auteur a réalisé de nombreux travaux, principalement sur l'évolution des composés volatils pendant la maturation sur l'arbre ou après la récolte. Il a pu mettre en évidence le rôle des lactones et notamment de la γ décalactone dans l'arôme des fruits frais.

Mais peu d'études se rapportent aux constituants aromatiques de ces fruits après leur utilisation industrielle. On constate pourtant souvent des pertes d'arômes lors de l'élaboration de produits transformés (WOODROOF *et al.*, 1965; LI, 1967).

Depuis plusieurs années, nous nous préoccupons de l'utilisation industrielle des fruits du pêcher. A la suite d'une Action Concertée financée par la D.G.R.S.T., nous nous sommes intéressés aux modifications susceptibles d'affecter les constituants les plus lourds de l'arôme des pêches, sous l'influence des traitements d'appertisation et/ou de congélation. L'étude des constituants les plus volatils a fait l'objet des travaux d'une autre équipe (PAILLARD, 1976).

Matériel et méthodes

1. — *Les fruits*

Les fruits utilisés (cultivar *Pavie Babygold* 6) sont des pêches particulièrement adaptées à la fabrication d'oreillons au sirop. Ils proviennent d'un verger commercial homogène de la région de Nîmes. Une centaine de kilos de fruits ont été prélevés sur l'ensemble d'une cueillette destinée à la conserverie. Ces pêches, de belle présentation, ont subi néanmoins un tri au laboratoire afin de constituer un lot très homogène.

La majeure partie du travail a été réalisée sur les fruits de la récolte 1976, mais des analyses préliminaires avaient été effectuées en 1975, et des analyses de confirmation ont été renouvelées sur les fruits de la récolte 1977 prélevés dans le même verger et dans les mêmes conditions.

Les caractéristiques analytiques des fruits de la récolte 1976 sont les suivantes :

pH	3,70
Acidité libre	8,1 meq/100 g
Indice réfractométrique	12° Brix
Rapport pectines solubles/pectines totales	0,25

2. — *Protocole expérimental*

Les fruits retenus pour nos essais ont été répartis en trois lots. Le premier de ces lots a servi aux analyses des fruits frais, le deuxième a été appertisé tout de suite et le troisième a été surgelé et conservé 5 mois à — 20 °C avant qu'une partie ne soit appertisée à son tour, le reste étant analysé soit sans décongélation préalable, soit après une décongélation volontaire à l'air durant plusieurs heures (fruits oxydés). Les traitements technologiques effectués pour aboutir aux produits transformés sont identiques à ceux rapportés lors de travaux précédents (SOUTY *et al.*, 1967; 1975) : pelage à la soude chaude, oreillonnage mécanique, appertisation sous couverture de sirop, ou congélation à sec selon les cas. Dans le cas des fruits frais, afin d'éviter toute possibilité de modifications pouvant être amenées par le pelage à chaud, celui-ci a été effectué à la main.

Les analyses ont donc porté sur :

— les fruits frais,
— les fruits appertisés à partir des fruits frais,
— les fruits congelés (après conservation de 5 mois),
— les fruits appertisés à partir des fruits préconservés par congélation,
— les fruits oxydés, c'est-à-dire décongelés lentement à l'air.

Avant toute analyse, les fruits appertisés ont été stockés un minimum de trois mois.

3. — *Techniques analytiques*

Les constituants les plus volatils ayant été étudiés par ailleurs (PAILLARD, 1976), nous nous sommes surtout intéressés aux constituants les plus lourds et nous avons fixé en conséquence nos conditions de préparation et d'analyse des extraits aromatiques.

a) *Extraits aromatiques*

Les extraits aromatiques sont obtenus selon une technique inspirée de celle de BAYONOVE (1973). Trois kilogrammes de fruits, ou l'équivalent pour les fruits au sirop, sont broyés en présence d'un mélange antioxydant (acide ascorbique et acide citrique), puis traités par fractions de 750 g environ. Ces fractions sont distillées sous vide dans un évaporateur rotatif et les vapeurs piégées à — 20 °C. Le distillat est ensuite extrait à l'aide de pentane préalablement lavé à l'acide sulfurique puis distillé. L'extrait pentanique, séché sur Na_2SO_4 anhydre, est concentré par distillation lente jusqu'à élimination presque totale du solvant. On obtient ainsi un extrait aromatique d'un volume de 0,2 à 0,5 ml et qui possède bien l'odeur du produit de départ.

Cet extrait est injecté directement dans notre chromatographe, ou est conservé au congélateur, en ampoule scellée, avant de pouvoir être analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

b) *Analyses chromatographiques*

Nous avons utilisé un appareil VARIAN Aerograph, modèle 2700, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et muni d'un diviseur de sortie permettant une analyse olfactive des effluents. Le chromatographe est relié à un enregistreur et à un intégrateur VARIAN, modèle 485.

Quatre microlitres de l'extrait pentanique sont injectés en tête d'une colonne en acier inoxydable de 3 mètres de long et de diamètre intérieur 3,18 mm. Cette colonne est garnie de Carbowax 20 M terminé à l'acide téréphtalique à 1,5 p. 100 sur Chromosorb W 60/80 mesh. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement 225 et 235 °C. La température du four est programmée de 80 à 180 °C à la vitesse de 2 °C/min. Nous utilisons un débit d'hydrogène de 30 ml/min et un débit de gaz vecteur (azote) de 25 ml/min. Tous les échantillons ont été chromatographiés également à plus basse température (60 à 100 °C, à raison de 1 °C/min).

c) *Identifications*

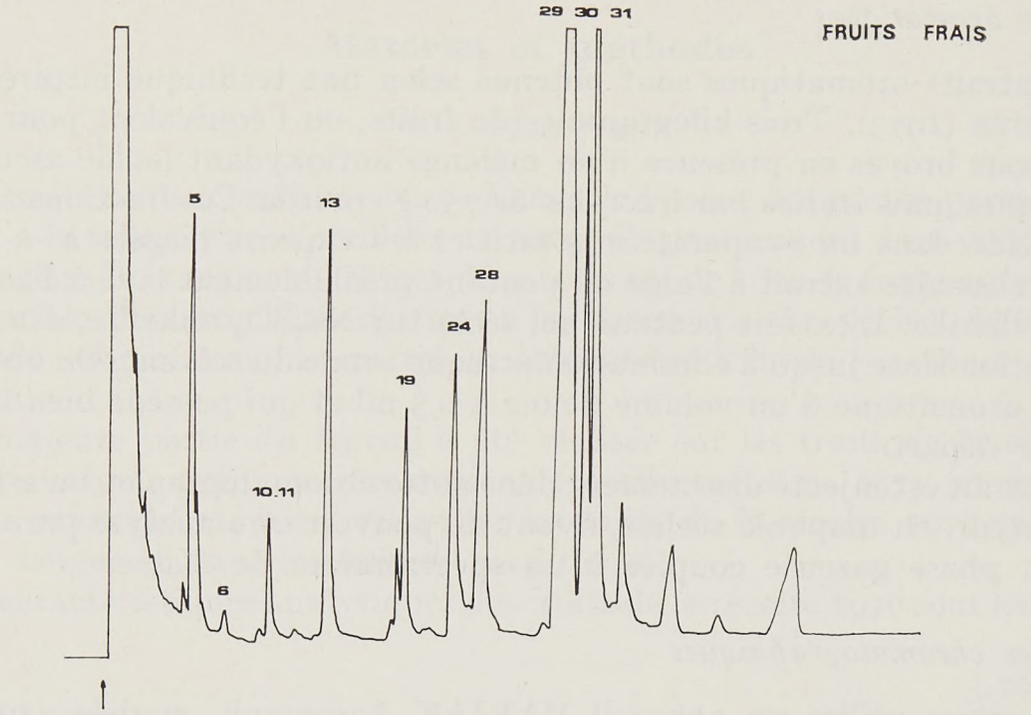
L'identification des composés séparés a été réalisée à la fois par les mesures des temps de rétention comparés à ceux de substances pures chromatographiées dans les mêmes conditions que les échantillons, par olfactométrie à la sortie de la colonne, et par spectrométrie de masse.

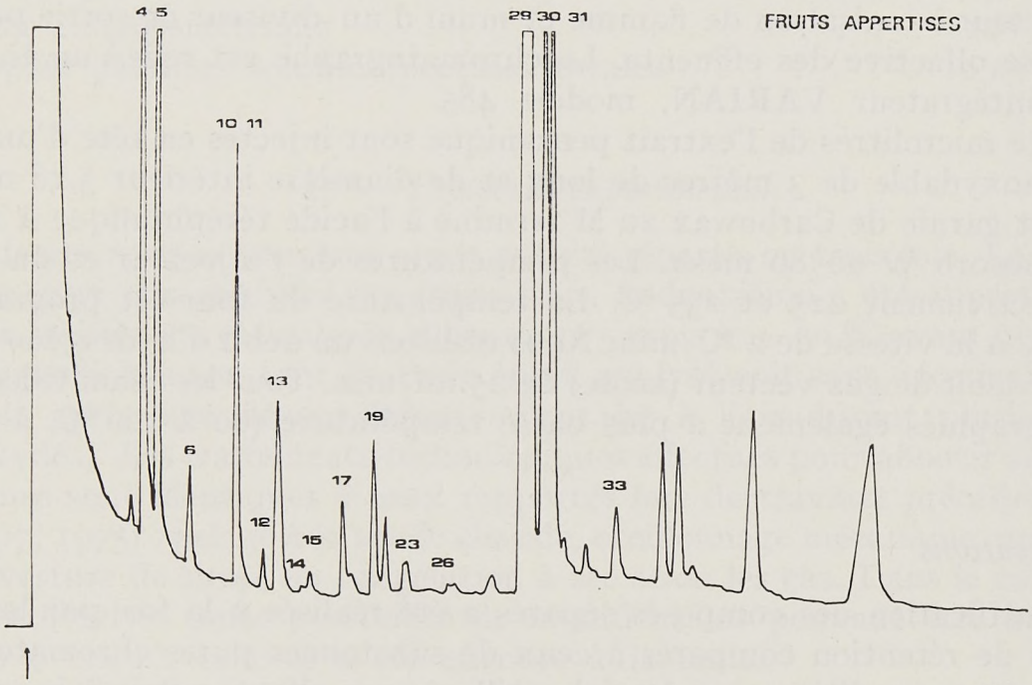
Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées à la Station de Technologie des Produits Végétaux de Dijon sur un spectromètre de masse VARIAN MAT CH5 couplé à un chromatographe GIRDEL muni d'une colonne identique à celle utilisée sur le chromatographe analytique.

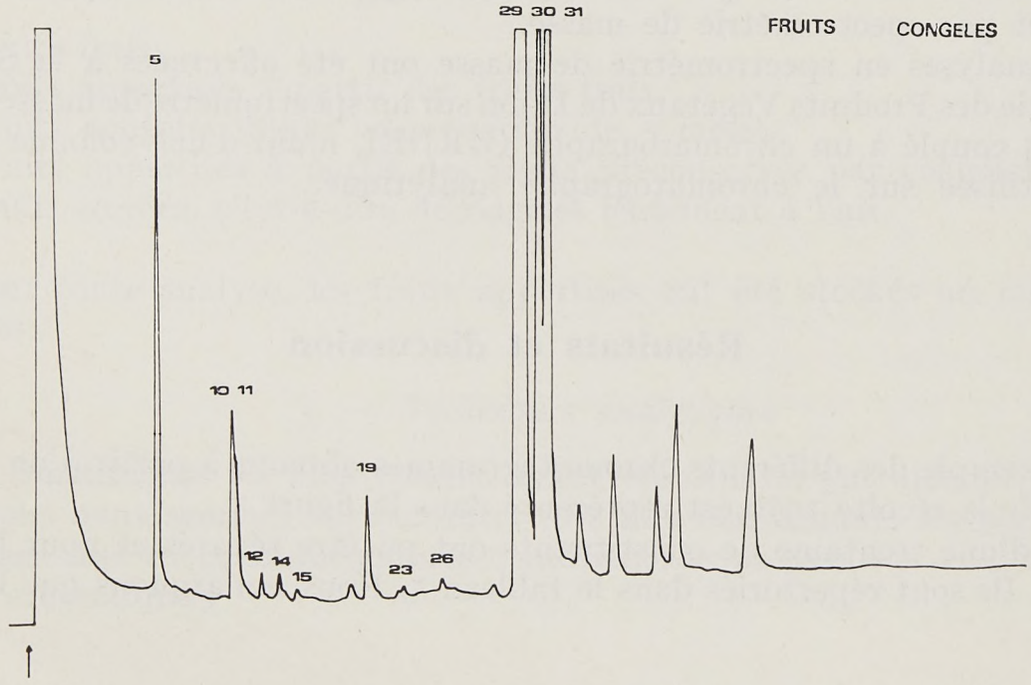
Résultats et discussion

Un exemple des différents chromatogrammes obtenus à partir d'un même lot de fruits de la récolte 1976 est représenté dans la figure 1.

Plus d'une trentaine de constituants ont pu être séparés et pour la plupart identifiés. Ils sont répertoriés dans le tableau 1. Nous remarquons que les images


FRUITS FRAIS
29 30 31
5
13
28
24
19
10.11
6


FRUITS APPERTISES
4 5
29 30 31
10 11
13
19
6
17
33
12
15
23
14
26


FRUITS CONGELES
29 30 31
5
10 11
19
12
14
15
23
26

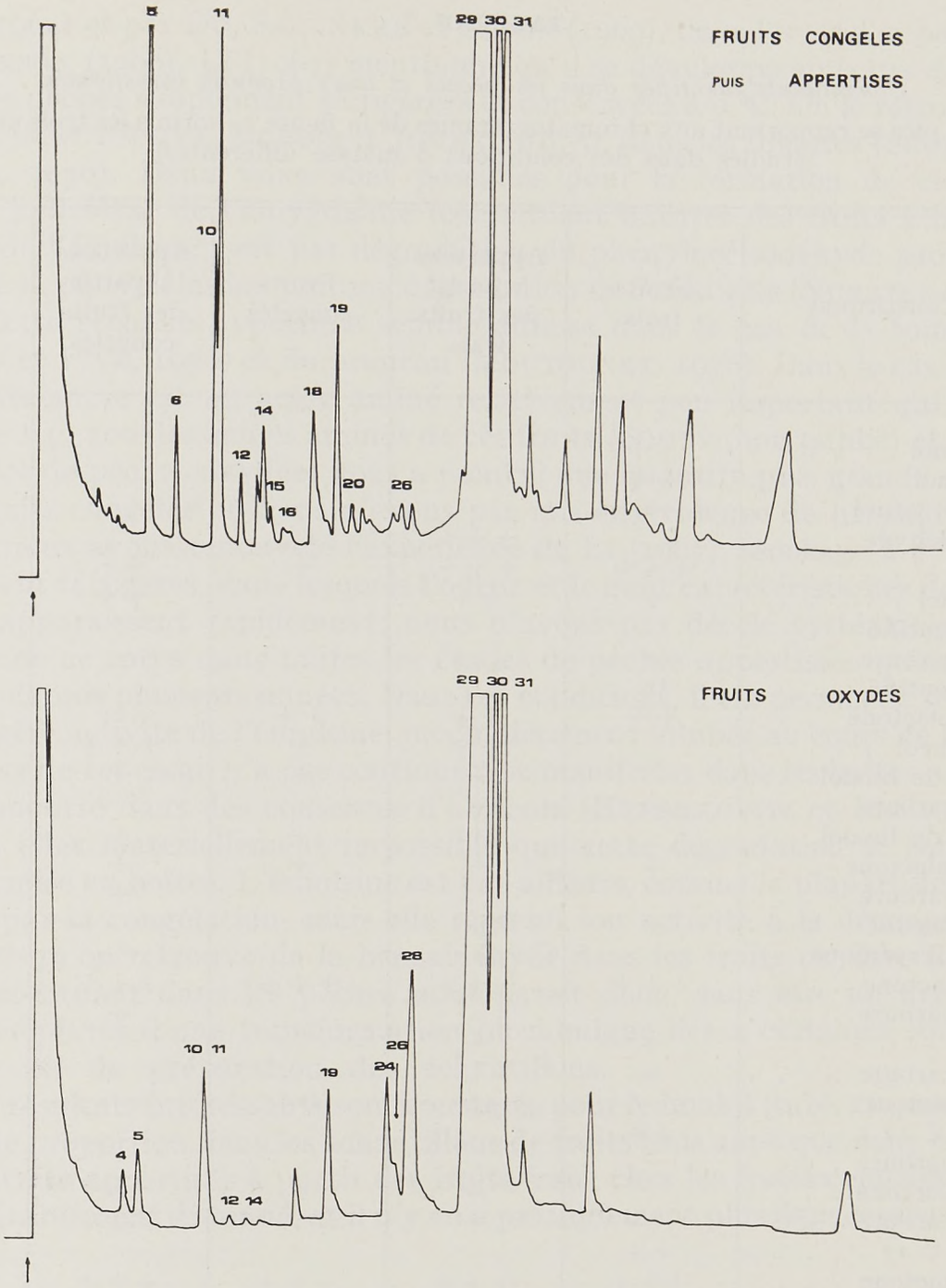


FIG. 1. — *Exemples des chromatogrammes des composés volatils lourds des pêches et de leurs produits transformés.*

(Pour l'identification des pics, se rapporter au tableau 1 ; pour les conditions de l'analyse chromatographique, voir le texte).

de ces différents chromatogrammes présentent quelques variantes. Tous les constituants séparés (sauf les pics 24 et 28) ont déjà été signalés dans l'arôme des pêches, mais certains d'entre eux présentent des particularités selon les traitements subis par les fruits.

En ce qui concerne les lactones et la pentyl-6 α pyrone, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences nettes et significatives selon les lots étudiés. Il semble donc que ces constituants, considérés comme caractéristiques de l'arôme des pêches, ne subissent aucune transformation, ni qualitative, ni quantitative, sous l'influence des traitements technologiques. Ceci explique pourquoi les produits de pêches conservent l'arôme caractéristique du fruit, dans la mesure où ils ne

TABLEAU I

Constituants identifiés dans les pêches et leurs produits transformés

(Les n^os des pics se rapportent aux chromatogrammes de la figure 1, hormis les trois premiers pics étudiés dans des conditions d'analyse différentes)

n° pic	Constituant	Fruits frais	Appertisés à partir des fruits frais	Fruits congelés	Appertisés à partir des fruits congelés	Fruits congelés oxydés
1.	*n* hexanol	++				
2.	*n* hexenol	++				
3.	Carbure saturé	++				
4.	Benzaldéhyde		+++			++
5.	Linalol	+++	+++	+	++	tr.
6.	Hotrienol	+	++		++	
7.	Non identifié					+
8.	Hydrocarbure	+				
9.	Non identlfié	tr.				
10.	γ caprolactone	++	++	++	++	++
11.	α terpinéol		++	+	+++	+
12.	Oxyde de linalol		+	+	+	+
13.	Hydrocarbure	+	+			
14.	Oxyde de linalol		+	+	+	+
15.	γ heptalactone	+	+	+	+	
16.	Hydrocarbure				+	
17.	Non identifié		+			
18.	Alcool terpénique				+	
19.	γ octalactone	+++	+++	+++	+++	+++
20.	Hydrocarbure				+	
21.		+	+			
22.	Hydrocarbure	+				
23.	δ octalactone		++	++		
24.	Alcool C 12	++				+
25.	Hydrocarbure					+
26.	γ-nonalactone		+	+	+	+
27.	Hydrocarbure		+		+	
28.	Alcool C 12	++				++
29.	γ-décalactone	+++	+++	+++	+++	+++
30.	Pentyl-6 α pyrone	+++	+++	+++	+++	+++
31.	δ décalactone	+++	+++	+++	+++	+++
32.			+			
33.	δ undécalactone		+			
34.	γ-dodécalactone		+			

(+), (++), (+++) : signifient respectivement que le composé est présent en quantités faibles, moyennes ou fortes.
(tr.) : signifie qu'il est présent à l'état de traces. Nous n'avons rien mis lorsque le composé n'a pas été détecté.

subissent pas une cuisson trop poussée. amenant des goûts étrangers, ou que les produits les plus volatils ne sont pas trop altérés et ne conduisent également à des saveurs étranges (PAILLARD, 1976).

Nous avons observé la présence de benzaldéhyde en quantité importante dans les fruits appertisés à partir des fruits frais et en quantité moindre dans les fruits oxydés. Ce constituant est signalé dans les pêches par JENNINGS et SEVE-

NANTS (1964) et par DO, SALUNKHE et OLSON (1969), dans les airelles par CROTEAU et FAGERSON (1968). LI (1967) mentionne qu'il se développe au cours de la conservation de pêches simplement réfrigérées et conservées à 0 °C. On le retrouve dans le pruneau (MOUTOUNET, DUBOIS et JOURET, 1975), dans les tomates (SECK, CROUZET et PIVA, 1976). Deux voies sont possibles pour la formation de ce composé : soit par hydrolyse de l'amygdaline (constituant naturel des fruits à noyau) sous l'action de l'émulsine, soit par dégradation du phénylacétaldéhyde provenant lui-même de la phénylalanine par une dégradation de STRECKER (NURSTEN et WOOLFE, 1972). Cette seconde hypothèse semble admise dans le cas de la tomate (SECK, CROUZET et PIVA, 1976) et du pruneau (MOUTOUNET, 1976). Dans le cas des pêches, la phénylalanine est un acide aminé relativement peu important qui représente moins de 1 p. 100 des acides aminés de ces fruits (SOUTY, non publié) et son dosage dans le lot de pêches oxydées nous a montré une quantité plus grande que dans le lot de fruits congelés où nous n'avons pas mis en évidence de benzaldéhyde. Par ailleurs, nous avons renouvelé l'expérience de LI (1967), stockage à 0 °C de fruits simplement réfrigérés, dans lesquels l'odeur et le goût caractéristiques de la benzaldéhyde apparaissent rapidement; nous n'avons pas décelé systématiquement la présence de ce corps dans toutes les études de pêches appertisées que nous avons réalisées depuis plusieurs années. Dans ces conditions, il est permis de se demander si une légère activité de l'émulsine, incomplètement inhibée au cours de la pasteurisation lors de cet essai, n'a pas continué à se manifester dans les boîtes, comme cela a été démontré dans des conserves d'abricots (HERSHKOVITZ et KANNER, 1970) : il est en effet matériellement impossible que cette dégradation se soit produite avant la mise en boîtes. L'émulsine est par ailleurs, comme la plupart des enzymes, bloquée par la congélation, mais elle reprend son activité à la décongélation des fruits puisqu'on retrouve de la benzaldéhyde dans les fruits oxydés. La présence de ce constituant dans les pêches nous paraît donc, sans être un artéfact vrai, témoigner plutôt d'une transformation biochimique liée à certaines conditions de stockage ou de préparation des échantillons.

Des résultats intéressants sont constatés pour le linalol (tabl. 2) qui se retrouve en grande proportion dans les échantillons de fruits frais ainsi que dans les échantillons de fruits appertisés à partir des fruits frais; chez les fruits congelés, sa teneur a considérablement diminué, et il n'y en a pratiquement plus dans les fruits congelés

TABLEAU 2

Teneurs respectives en linalol et α-terpinéol des différents lots analysés

(Les résultats sont exprimés par rapport à la somme γ décalactone + pentyl-6 α pyrone + δ décalactone, en p. 100)

Constituants	Fruits frais	Appertisés à partir des fruits frais	Fruits congelés	Appertisés à partir des fruits congelés	Fruits congelés oxydés
Linalol	8	28	6	10	2
α-terpinéol	0	7	4	10	4

puis oxydés. Ceci rejoint l'observation faite par LI (1967) sur des purées de pêches. Cette disparition du linalol se fait au profit d'oxydes furanniques et pyranniques que l'on trouve dans les produits transformés, mais jamais dans les fruits frais. On peut donc penser qu'au cours du traitement préliminaire des fruits (conservation par congélation, ou broyage pour l'obtention des purées) il se produit une oxydation plus ou moins importante du linalol qui conduit à une perte d'arôme du produit transformé par rapport au produit frais de départ. RIBÉREAU-GAYON, BOIDRON et TERRIER (1975) précisent en effet que ces oxydes, que l'on trouve à côté du linalol, sont de 30 à 60 fois moins odorants que le linalol lui-même.

Le diméthyl-3,7 octatriène-1,5,7 ol-3 ou trans hotrienol, identifié avec certitude par BAYONOVE, RICHARD et CORDONNIER (1976) dans les Muscats et retrouvé dans certaines variétés de pêches (BAYONOVE, 1977), paraît plutôt, ici, être un produit développé au cours de l'appertisation. Nous ne l'avons en effet pas mis en évidence, ni dans les fruits frais, ni dans les fruits congelés et pas plus en 1976 qu'en 1977. Ce constituant apparaît cependant comme un composé particulièrement important dans les raisins Muscat (BAYONOVE et CORDONNIER, 1971; TERRIER et BOIDRON, 1972; RIBÉREAU-GAYON, BOIDRON et TERRIER, 1975) bien que son identification certaine y soit récente. L'hotrienol a également été signalé dans les extraits de thé (NAKATANI, SATO et YAMANISHI, 1969) et dans l'essence de sureau utilisée parfois pour renforcer l'arôme des Muscats. La concentration de ce composé est variable selon les cultivars de raisins Muscat analysés. Il apparaît en quantités moindres dans les variétés non Muscat dites aromatiques, alors qu'il est inexistant dans les variétés non aromatiques (TERRIER, 1972). On peut donc penser que c'est bien un constituant naturel à côté des autres terpènes rencontrés en quantités plus importantes et, dans le cas qui nous intéresse, l'appertisation semble favoriser sa détermination.

Dans les analyses que nous avons effectuées, nous ne remarquons la présence d'α-terpinéol que dans les produits transformés (tabl. 2). L'α-terpinéol peut provenir de l'oxydation du limonène, ou de la cyclisation du géraniol et du nérol sous l'influence des traitements technologiques (TERRIER, BOIDRON et RIBÉREAU-GAYON, 1972). Cet α-terpinéol est 4 fois moins odorant que le géraniol qui lui, a sensiblement le même seuil que le linalol.

Il semble que ces alcools terpéniques jouent un grand rôle dans l'arôme de la pêche, d'une part parce qu'ils sont présents en quantité importante et d'autre part, du fait de leur grand pouvoir odorant.

Les produits appertisés obtenus à partir des fruits frais conservent en général un bon capital aromatique parce que l'oxydation du linalol n'a pas eu le temps de se réaliser totalement; il semblerait même que le traitement thermique joue le rôle d'un « renforçateur » du linalol (signalé pour les tomates : BUTTERY *et al.*, 1971), de l'α-terpinéol (signalé également pour les abricots : RODRIGUEZ, 1977) et enfin de l'hotrienol comme nous l'avons vu.

Au cours de la conservation du produit congelé, il se produit par contre une oxydation non négligeable du linalol, ce qui se traduit par des produits élaborés sensiblement moins odorants. Le phénomène est très net si l'on considère les fruits volontairement oxydés. Il est à noter que dans le cas de la conservation par congélation, cette oxydation du linalol s'est produite sans la manifestation habituelle de l'oxydation, c'est-à-dire en l'absence visible du brunissement. Ceci est encore à rapprocher des observations de TERRIER (1972) qui signale que dans les jus de raisin Muscat du commerce et présentant bien le type Muscat, le linalol est absent alors que la présence de ce corps est universellement admise dans les raisins de ces cépages : il a donc disparu au cours des traitements technologiques.

Les pics 24 et 28 de nos chromatogrammes correspondent à des alcools aliphatiques en C_{12} qu'il ne nous a pas été encore possible de préciser. Nous remarquons qu'ils n'apparaissent que dans les fruits frais et dans les fruits oxydés.
Par ailleurs, lors des analyses chromatographiques effectuées à plus faibles températures, nous avons mis en évidence dans les fruits frais l'hexanol et le trans hexène-2-ol-1 qui ne se retrouvent ni dans les fruits appertisés, ni dans les fruits congelés (tabl. 1). Des résultats similaires ont été constatés dans le raisin subissant le métabolisme anaérobie (DUBOIS *et al.*, 1977) et dans des abricots appertisés (RODRIGUEZ, 1977). Ces alcools sont formés à partir des acides linoléique et linolénique (PAILLARD 1974). Dans le cas des abricots, dans un extrait aromatique de fruits frais obtenu après inactivation des enzymes par le méthanol selon la technique de SCHREIER, DRAWERT et JUNKER (1976), RODRIGUEZ (1977) décèle moins d'hexanal, d'hexanol, de trans hexène 2-ol-1 et de cis hexène 3-ol-1 que dans le produit obtenu directement, ce qui confirme bien l'hypothèse de formation enzymatique de ces constituants (DRAWERT, 1974) pendant le broyage et la préparation des échantillons. Dans son étude sur les substances les plus volatiles de l'arôme des pêches, PAILLARD (1976) a montré par l'analyse des produits volatils « relargués », en présence de sulfate d'ammonium, par des pêches fraîches ou congelées, la présence d'environ 25 pics, principalement des alcools (éthanol, butanol), des esters (acétates de méthyle, d'éthyle, de butyle et butyrate d'éthyle) et deux aldéhydes (hexanal et hexen-2-al). Or, le passage de l'aldéhyde à l'alcool est une réaction catalysée par une alcool déshydrogénase en présence de NAD :

$$\text{aldéhyde} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftarrows \text{alcool} + \text{NAD}^+$$

Au vu de ces différents résultats, il apparaît que l'appertisation et la congélation conduisent à l'inhibition des systèmes enzymatiques responsables de ces transformations. Si l'appertisation semble agir en bloquant les réactions enzymatiques dès les précurseurs, la congélation bloquerait surtout le stade ultime, amènerait une déviation du métabolisme normal (bloquage de la lipoxygénase), expliquant ainsi les accumulations d'aldéhydes considérés comme responsables des « odeurs d'herbe » des produits congelés.
C'est certainement par un mécanisme analogue de réactions enzymatiques que l'on peut expliquer la formation des alcools en C_{12} puisqu'on ne les met pas en évidence dans les produits appertisés; ils proviennent probablement des acides oxo-dodécéniques indiqués par DRAWERT (1974).

Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les traitements technologiques subis par les pêches pour l'élaboration des fruits au sirop influent surtout sur les transformations des constituants terpéniques (fig. 2), alors que les lactones ne sont pas affectées. Ces transformations sont le fait d'oxydations des alcools terpéniques, principalement du linalol et sont accentuées par la congélation préalable des fruits. Il s'en suit, dans le cas des fruits préalablement congelés, une perte d'arôme sensible, un affadissement, par rapport aux produits élaborés à partir des fruits frais; mais si l'on prend des précautions pour éviter l'oxydation des fruits congelés (PHILIPPON et ROUET-MAYER, 1973) il est possible d'obtenir des fruits appertisés à partir des fruits préconservés par congélation dans des conditions très satisfaisantes pour le consommateur (SOUTY *et al.*, 1975).

Il semble par ailleurs que l'appertisation favorise le développement de composés terpéniques (hotriénol, α-terpinéol) dont la part dans l'arôme des produits considérés apparaît non négligeable.

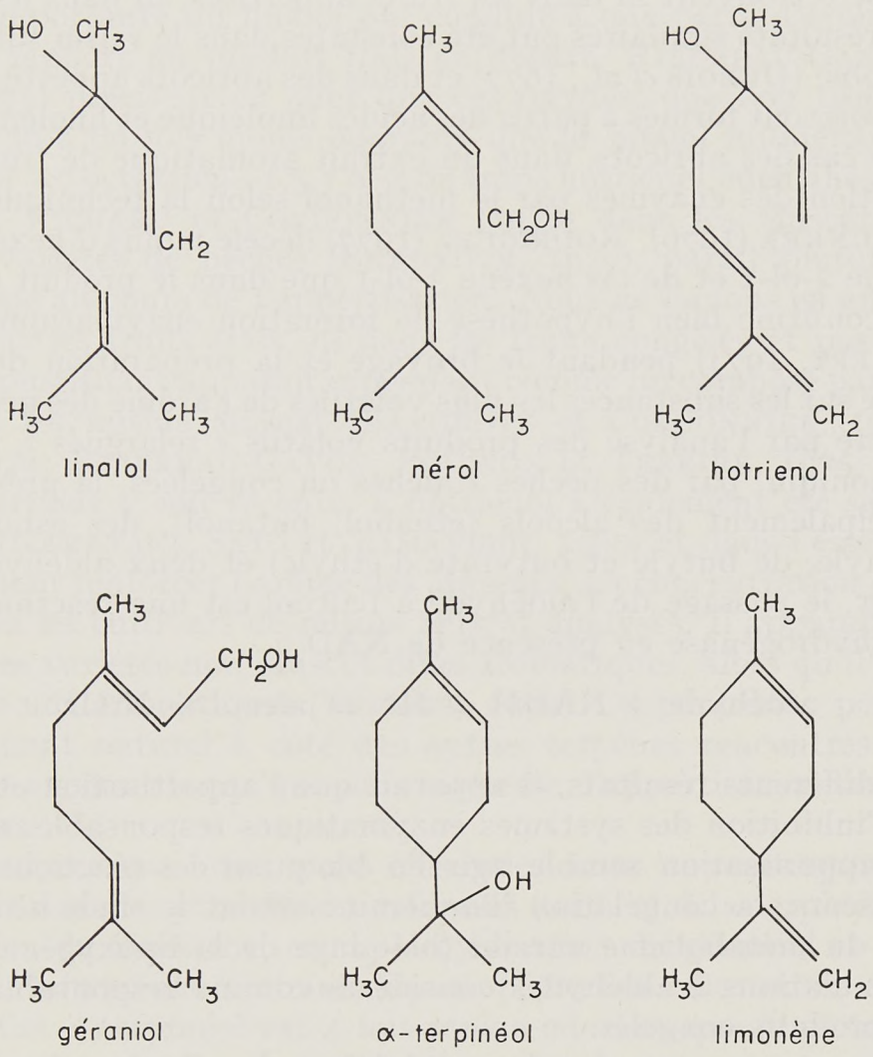


FIG. 2. — *Structures chimiques de quelques substances terpéniques.*

La cinétique et les conditions d'oxydation du linalol doivent maintenant être étudiées avec précision au cours du stockage des fruits. Ceci permettra alors de déterminer la durée maximale possible de ce stockage avant utilisation des fruits en assurant l'obtention de produits possédant encore un bon niveau aromatique.

Reçu pour publication en juin 1978.

Remerciements

Nous remercions M. P. DUBOIS et J. RIGAUD (Station de Technologie des Produits Végétaux, I.N.R.A., Dijon)pour l'identification des composés volatils par spectrométrie de masse.

Nous remercions également M. P. DOMANGE ,Arboriculteur à Bellegarde (30) de nous avoir permis de prélever dans son verger les fruits nécessaires à nos travaux.

Summary

Effects of processing treatments (freezing and canning) on certain peach aromatic substances

The major volatile constituents of fresh peaches are well known, and mainly the occurence of lactonic compounds. Concerning peach products, relatively few works have been made on the changes of aromatic substances occuring after processing treatments. PAILLARD (1976) studied the more volatile fraction of thawed peaches.

In this work, we payed a particular attention to the less volatile fraction. Analyses were conducted on: fresh peaches, canned peaches (using fresh fruits for canning), frozen peaches (after 5 months storage), canned peaches (using frozen fruits for canning), and thawed, oxidized, peaches.

This study was made using an extract obtained after vacuum-distillation of the puree, with the aid of gas-chromatography and mass-spectrometry.

Lactonic compounds are involved in any changes after processing treatments. But it is not the same with terpenic compounds. This changes are oxidations of terpenic alcohols, mainly linalool; they are increasing with freezing of fruits. Two C_{12} aliphatic alcohols have been found in fresh and in oxidized fruits, but not in canned fruits. They come probably from oxo-dodecenic acids (DRAWERT, 1974).

Key-words: *peaches, processing, aroma.*

Références bibliographiques

BAYONOVE C., 1973. Recherches sur l'arôme de la pêche. I. Évolution des constituants volatils au cours de la maturation de la variété Cardinal. *Ann. Technol. agric.*, **22**, 35-44.

BAYONOVE C., 1974. Évolution des composés volatils de la pêche pendant la maturation, après récolte. Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits. *Coll. Intern. C.N.R.S.*, Paris, 327-333.

BAYONOVE C., 1977. C. R. Groupe de Travail Qualité Pêches. Résultats 1976. Bordeaux, 22 février.

BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1971. Recherches sur l'arôme du Muscat. III. Étude de la fraction terpénique. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 347-355.

BAYONOVE C., RICHARD H., CORDONNIER R, 1976. Isolement et identification du diméthyl-3,7 octatriène-1,5, 7 ol-3 ou trans hotrienol, constituant à odeur de Tilleul de l'huile essentielle du Muscat de Frontignan. *C. R. Acad. Sci.*, **283**, Série C, 549-551.

BUTTERY R. G., SEIFFERT R. M., GUADAGNI D. G., LING L. C., 1971. Characterization of additional volatile component of Tomato. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 524-529.

CROTEAU R. J., FAGERSON I. S., 1968. Major volatile components of the juice of american Cranberry. *J. Food Sci.*, **33**, 386-389.

DO J. Y., SALUNKHE D. K., OLSON L. E., 1969. Isolation, identification and comparison of the volatiles of peach fruit as related to harvest maturity and artificial ripening. *J. Food Sci.*, **34**, 618-621.

DRAWERT F., 1974. Formation des arômes à différents stades de l'évolution du fruit; enzymes intervenant dans cette formation. Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits. *Coll. Intern. C.N.R.S.*, Paris, 309-319.

DUBOIS P., ETIEVANT P., DEKIMPE J., BURET M., CHAMBROY Y., FLANZY C., 1977. Étude sur l'arôme des vins de macération carbonique. *C. R. Acad. Agric.*, **63**, 1183-1189.

HERSHKOVITZ E., KANNER J., 1970. The effect of heat treatment on the β glucosidase activity on canned whole apricots. *J. Food Technol.*, **5**, 197-201.

JENNINGS W. G., SEVENANTS M. R., 1964. Volatile compounds of peach. *J. Food Sci.*, **29**, 796-801.

LI K. C., 1967. Peach flavor as related to processing. C. R. Conf. on Peach Processing and Utilization, EXPERIMENT, 31-36.

MOUTOUNET M., 1976. Les constituants volatils de la prune d'ente et du pruneau d'Agen. C. R. ATP Arômes, I.N.R.A.

MOUTOUNET M., DUBOIS P., JOURET C., 1975. Les composés volatils majeurs du pruneau d'Agen. *C. R. Acad. Agric.*, **61**, 581-585.

NAKATANI Y., SATO S., YAMANISHI T., 1969. 3.7-diméthyl-1.5.7 octatriene 3-ol in the essential oil of black tea. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 967-968.

NURSTEN H. E., WOOLFE M. L., 1972. An examination of the volatile compounds present in cooked Bramley's seedling apples and the changes they undergo on processing. *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 803-822.

PAILLARD N., 1974. Biosynthèse de produits volatils à partir d'acides gras, par des disques de tissus de pomme. Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits. *Coll. Intern. C.N.R.S.*, Paris, 321-326.

PAILLARD N., 1976. Effets de la congélation et de différents traitements annexes sur les constituants volatils des pêches congelées. *Rev. Gen. Froids*, 845-854.

PHILIPPON J., ROUET-MAYER M. A., 1973. Décongélation des fruits à noyau. Prévention des brunissements enzymatiques. *Rev. Gen. Froid*, 487-493.

RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., TERRIER A., 1975. Aroma of Muscat grape Varieties. *Agr. and Food Chem.*, **23**, 1042-1047.

RODRIGUEZ F., 1977. Composés volatils extraits de l'abricot, variété Rouge du Roussillon. D.E.A., Université Montpellier.

SCHREIER P., DRAWERT F., JUNKER A., 1976. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agr. Food Chem.*, **24**, 331-336.

SECK S., CROUZET J., PIVA M. T., 1976. Influence des traitements thermiques sur la nature des constituants volatils de la tomate. *Ann. Technol. agric.*, **25**, 85-95.

SOUTY M., POGGI A., BREUILS L., 1967. Données techniques intéressant la technologie des pêches de conserve. Connaissance du matériel végétal. *Bull. Techn. d'Inf.*, n° 220, 505-522.

SOUTY M., REICH M., BREUILS L., JACQUEMIN G., 1975. Aptitudes à la congélation des fruits du pêcher. Possibilités d'utilisation en conserverie. C. R. XIV *Cong. Intern. Froid*, Moscou, (sous presse).

TERRIER A., 1972. Les composés terpéniques dans l'arôme des raisins et des vins de certaines variétés de *Vitis Vinifera*. Thèse de Docteur-Ingénieur, Bordeaux, 87 p.

TERRIER A., BOIDRON J. N., 1972. Identification des dérivés terpéniques dans les raisins de certaines variétés de *Vitis Vinifera*. *Conn. Vigne Vin*, 147-160.

TERRIER A., BOIDRON J. N., RIBÉREAU-GAYON P., 1972. Teneurs en composés terpéniques des raisins de *Vitis Vinifera*. *C. R. Acad. Sci.*, **275**, série D, 941-944.

WOODROOF J. G., HEATON E. K., BOGGESS T. S. Jr., LI K. C., MURPHY M. M., 1965. Development of peach products. Res. Prog. Rep. n° 12, ARS, USDA, Washington.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 849-871.

Mise au point bibliographique.

Facteurs influencant les pertes d'eau pendant la cuisson de la viande

M. LAROCHE

Station de Recherches sur la Viande
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I.N.R.A.
Theix, 63110 Beaumont

Résumé

Les facteurs influençant les pertes d'eau pendant la cuisson de la viande sont de deux types. D'une part ceux qui modifient la liaison de l'eau dans le muscle, d'autre part ceux qui déterminent la migration de l'eau hors du morceau.

La liaison de l'eau dans le muscle dépend de facteurs zootechniques, du pH, du degré de maturation et des conditions de cuisson.

La migration de l'eau hors du morceau dépend principalement des caractéristiques géométriques des échantillons. Le pH, l'état de contraction et le degré de maturation doivent également être considérés.

Après avoir envisagé l'influence de ces facteurs, nous avons considéré les conséquences de quelques traitements technologiques, congélation, emploi d'additifs et saumurage à chaud, puis les relations entre les pertes de poids à la cuisson et la jutosité de la viande.

Mots-clés : *revue bibliographique, viande, pertes de poids à la cuisson.*

Introduction

La viande est, dans sa quasi-totalité, consommée après une cuisson. Cette transformation, qui peut être effectuée par l'industriel ou par la ménagère, détermine les caractéristiques organoleptiques du produit consommé et s'accompagne de pertes de poids.

Pour le consommateur, il n'est pas agréable de voir « fondre » la grillade dans la poêle et, de plus, les pertes de poids modifient la texture du produit et, par conséquent, influent sur les sensations de tendreté et de jutosité lors de la consommation du morceau. Pour l'industriel, ces pertes ont une répercussion directe sur

les rendements technologiques et donc économiques et différents procédés sont développés pour les minimiser.

Les études de l'influence de la cuisson sur les caractéristiques organoleptiques des viandes concernent principalement la tendreté (LAAKKONEN, 1973) et, dans la majorité des cas, les pertes de poids sont seulement mentionnées. Des résultats récents (LAROCHE et SALE, 1977) nous ont montré qu'après des chauffages rapides le pouvoir de rétention d'eau, déterminé en utilisant la méthode décrite par GOUTEFONGEA (1966), dépend uniquement de la température de chauffage, alors que les pertes de poids dépendent également du temps de chauffage. Il apparaît donc que les pertes d'eau à la cuisson sont la résultante de deux actions, une « dé-liaison » de l'eau sous l'effet de la chaleur puis une migration vers le milieu extérieur.

Avant d'examiner le déterminisme de ces deux actions, il est nécessaire d'envisager quelques généralités sur la liaison de l'eau dans le muscle, la définition (scientifique et culinaire) de la notion de cuisson et la nature des pertes de poids.

I. — Généralités

1.1. — *L'eau dans le muscle*

La viande crue contient environ 75 p. 100 d'eau et 18 p. 100 de protéines (LAWRIE, 1974). Ceci correspond à environ 10 fois la quantité d'eau d'hydratation communément admise pour les protéines purifiées (WIERBICKI et DEATHERAGE, 1958). BULL et BRESS (1968) ont montré que l'hydratation des protéines est fortement reliée à la somme des résidus polaires moins les amides, chaque résidu complexant environ 6 moles d'eau. Différentes hypothèses sont envisagées pour expliquer la structure de l'eau et son état physique dans les systèmes biologiques (KARMAS, 1973) ainsi que les relations protéine-eau (LUMRY, 1973). Elles ont toutes une base commune, la structure dipolaire de l'eau qui permet la formation de liaison hydrogène entre les molécules.

A côté des méthodes permettant de mesurer la teneur en eau des produits (PETTINATI *et al.*, 1973), nous pouvons citer les mesures d'activité de l'eau (BEM et LEISTNER, 1970, RODEL et LEISTNER, 1971-1972), de densité (POCSIK, 1967), d'eau non solvante (LINDENBERG et GARY-BOBO, 1960), l'analyse thermique différentielle (KARMAS et DI MARCO, 1970*a* et *b*), la résonance magnétique nucléaire (LEUNG *et al.*, 1976), les équilibres de pression (GEURTS *et al.*, 1974) qui peuvent donner des informations sur la liaison de l'eau aux protéines.

Il est possible également de tracer les isothermes de sorption. Dans le cas de la viande, pour éviter les altérations de l'échantillon dues à des réactions enzymatiques ou au développement de micro-organismes pendant le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre, on limite l'étude à la sorption de la viande lyophilisée. Dans ce cas, ces isothermes (HAMM, 1960) montrent les différents niveaux de liaison de l'eau dans le muscle (fig. 1). Le premier niveau (*a*) est fortement lié aux groupes hydrophiles. Le second niveau (4-6 p. 100) (*b*) serait dû aux mêmes groupes hydrophiles, mais la liaison est beaucoup plus faible. Le troisième niveau (*c*) peut être attribué à la condensation capillaire entre les surfaces hydratées. L'étude de la réhydratation de la viande lyophilisée montre en effet que la pénétration de l'eau obéit aux lois de l'écoulement dans des tubes capillaires (WATSON *et al.*, 1974). Il faut souligner l'importance quantitative de ce niveau. En effet, HAMM (1962*b*)

indique que, sur les 350 grammes d'eau d'hydratation pour 100 grammes de protéines on ne met en évidence, suivant la méthode, que de 16 à 50 grammes d'eau effectivement liée aux protéines.

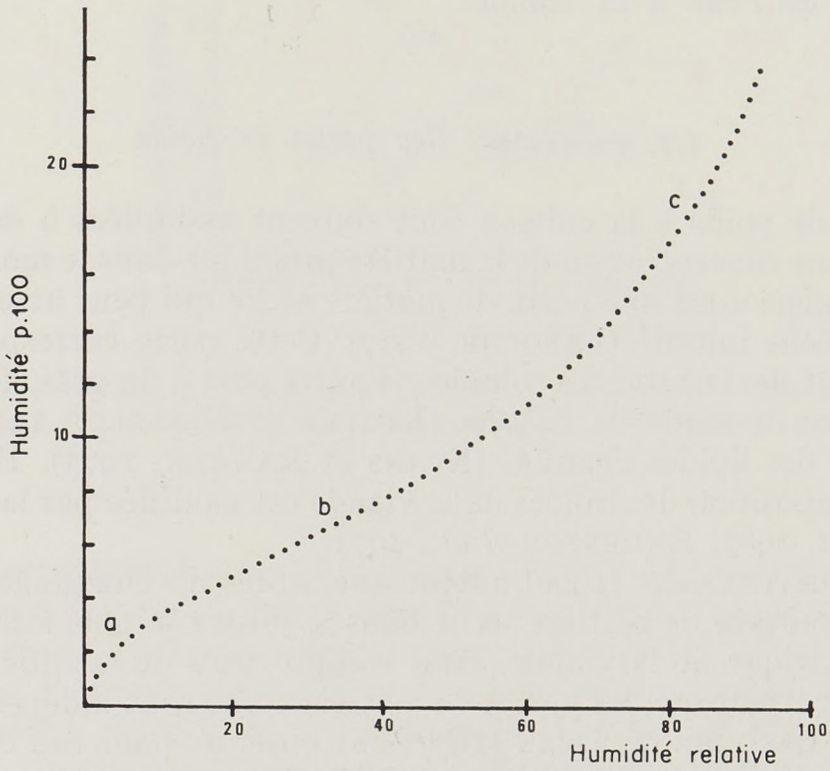


FIG. 1. — *Isotherme de sorption de viande de bœuf lyophylisée.*
D'après HAMM (1960).

Dans le cas de la viande, pour caractériser le dernier niveau de liaison de l'eau, il est fait appel à la notion de capacité (ou pouvoir) de rétention d'eau (Water Holding Capacity). Il s'agit de la faculté de la viande à conserver, dans des conditions bien définies, son eau propre ou de l'eau ajoutée (HAMM, 1960). De nombreuses méthodes ont été développées, utilisant la pression (GRAU et HAMM, 1958; WIERBICKI et DEATHERAGE, 1958; GOUTEFONGEA, 1960; HOFMANN, 1971), la centrifugation (BOUTON *et al.*, 1971) ou le chauffage (KOTTER *et al.*, 1968). Une méthode récente (HOFFMANN, 1975) considère les forces capillaires dans le tissu musculaire. Dans le cas des méthodes par pression, la quantité d'eau perdue n'est pas directement reliée à la pression exercée mais présente plusieurs paliers correspondant à des degrés de liberté différents (WIERBICKI et DEATHERAGE, 1958). De plus, GOUTEFONGEA (1963) a montré que les résultats obtenus par des méthodes de compression et de centrifugation sont bien reliés entre eux. Ce type d'essais peut permettre des comparaisons entre muscles ou l'étude de l'influence de différents paramètres sur l'hydratation de la viande, mais il faut souligner d'une part que les résultats dépendent de la méthode utilisée et d'autre part, que le pouvoir de rétention d'eau mesuré est affecté par le développement de micro-organismes sur la viande (JAY, 1966).

HAMM (1960) a étudié la contribution relative de chaque constituant musculaire au pouvoir de rétention d'eau de la viande. Il a montré que 65 p. 100 étaient dus aux protéines de structure, parmi lesquelles la myosine (34-38 p. 100 des protéines) montre une interaction spécifique avec l'eau, 5 p. 100 aux protéines

sarcoplasmiques et 30 p. 100 aux composés solubles non protéiques. Pour leur part, en utilisant la résonance magnétique nucléaire, BELTON *et al.* (1972) trouvent 20 p. 100 de l'eau liée, 15 p. 100 immobilisée dans les espaces extracellulaires et 65 p. 100 retenue par les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique. Ces deux résultats montrent bien l'importance du système contractile et des effets stériques dans la liaison de l'eau à la viande.

1.2. — *Nature des pertes de poids*

Les pertes de poids à la cuisson sont souvent assimilées à des pertes d'eau qui entraînent une concentration de la matière protéique dans le morceau (DEBROT, 1974) et l'on néglige ainsi une perte de matière sèche qui peut atteindre 20 p. 100 de la matière sèche initiale (LAROCHE, 1977). Cette perte correspond d'une part à des protéines et des substances solubles, d'autre part à du gras. La perte de gras est variable selon le mode de cuisson (KELLER et KINSELIA, 1973) et selon les caractéristiques des lipides chauffés (EVANS et RANKEN, 1975). Il faut d'ailleurs noter que la composition des lipides de la viande est modifiée par la cuisson (CAMPBELL et TURKKI, 1967; ANDERSON *et al.*, 1971.)

HAMM et DEATHERAGE (1960) notent que, après un chauffage de 30 minutes à 80 °C, le pourcentage de matière sèche dans le jus est le plus faible dans la zone du point isoélectrique de la viande, mais compte tenu de la différence de pertes de poids, ils admettent que les pertes de matière sèche sont indépendantes du pH. Pour leur part, LAROCHE et VALIN (1977) ont observé, pour des cuissons longues d'échantillons baignant dans leur jus, que l'ammoniac, les acides aminés libres et l'azote non précipitable par l'acide tri-chloro-acétique (5 p. 100) se trouvaient en concentrations pratiquement identiques dans la viande et dans le jus. Cette diffusion de substance soluble n'a pas été étudiée pour l'instant.

1.3. — *Conditions de cuisson*

La pratique culinaire a développé de nombreuses méthodes de cuisson de la viande. Pour l'étude de cette transformation, deux types de chauffages sont utilisés. Pour quelques auteurs, il est nécessaire que le temps d'équilibrage de la température dans l'échantillon soit négligeable par rapport au temps de chauffage total de façon à obtenir un résultat homogène pour l'ensemble du morceau traité. Cependant, la majorité des auteurs, pour être proches des conditions réelles d'utilisation de la viande, considèrent une température finale à cœur donnée.

Sur un plan strictement thermique, deux facteurs sont à considérer : le temps et la température de chauffage. Pour les échantillons n'ayant pas été soumis à un traitement thermique homogène, il faut également tenir compte de la vitesse de chauffage, paramètre qui fait intervenir les coefficients d'échanges thermiques et l'évaporation en surface. Il existe dans ces conditions des interférences nombreuses entre les différents facteurs. Par exemple une vitesse de chauffage plus rapide implique une température de surface supérieure et un temps plus court, et selon les cas l'un des facteurs devient prépondérant. Par exemple, BENGTSSON *et al.* (1976), (fig. 2) et CROSS *et al.* (1976) observent des pertes plus importantes pour un chauffage à même température à cœur lorsque la température du four augmente, mais BAYNE *et al.* (1972), travaillant avec des températures de four

beaucoup plus basses, donc avec des temps de chauffage beaucoup plus longs, observent le résultat contraire.

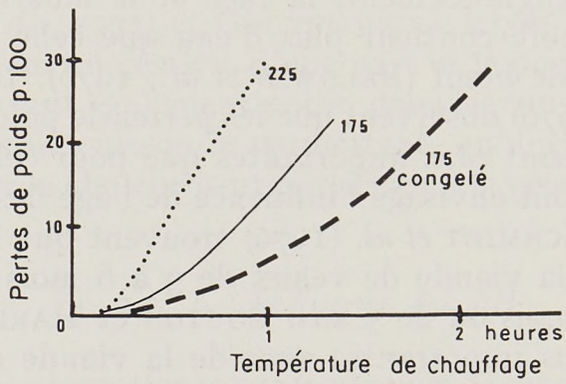


FIG. 2. — *Cinétique des pertes de poids pour obtenir une température à cœur de 70 °C en fonction de la température du four avec de la viande décongelée ou non.* D'après BENGTSSON *et al.* (1976)

Le chauffage jusqu'à une température à cœur donnée peut permettre la comparaison de différents modes de chauffage utilisés dans la pratique. Schématiquement, la cuisson peut être effectuée avec une chaleur sèche ou une chaleur humide et selon SHAFFER *et al.* (1973), les pertes de poids sont plus importantes en chaleur humide. SCHOCK *et al* (1970) observent que la friture dans l'huile à 100 °C entraîne des pertes comparables à celles obtenues par cuisson à la vapeur, bien que le temps de chauffage soit plus court. La chaleur sèche peut être fournie sous différentes formes. Les pertes de poids sont plus importantes pour une viande grillée cuite beaucoup plus rapidement qu'une viande rôtie (BATCHER et DEARY, 1975), mais elles sont comparables pour des échantillons grillés ou frits (JANICKI et APPLEDORF, 1974). Les effets de surface, différents selon le mode de chauffage, doivent également être considérés. Pendant le rotissage de la viande par exemple, la coagulation des protéines en surface freine les pertes de liquide et ANDROSS (1949) a montré que plus le chauffage est rapide, plus la formation de cette couche est importante et plus les pertes sont faibles.

La comparaison entre eux des différents modes de chauffage est cependant très délicate. En effet, chacun se caractérise par un flux thermique particulier et la cuisson est déterminée par une température à cœur donnée, il n'est donc pas possible d'obtenir des échantillons homogènes et comparables. Dans ces travaux, un nombre important de facteurs est négligé et les résultats ne peuvent être utilisés que pour des comparaisons dans l'étude considérée.

II. — Facteurs influençant la liaison de l'eau dans le muscle

Le relargage de l'eau en cours de cuisson est déterminé par le pouvoir de rétention d'eau du muscle cru et les conditions de cuisson. Nous allons donc envisager successivement l'influence des facteurs zootechniques, de l'état de maturation de la viande et des conditions de cuisson sur le relargage de l'eau au cours du chauffage.

2.1. — *Facteurs zootechniques*

Des différences de pouvoir de rétention d'eau sont observées suivant l'espèce, le sexe, l'âge, l'état d'engraissement, la race et le muscle (HAMM, 1960). Après cuisson, la viande de porc contient plus d'eau que celle de mouton, et celle de mouton plus que celle de bœuf (BALDWIN *et al.*, 1976). Dans le cas de la dinde, Mac NEIL et DIMICK (1970) observent que les pertes de poids à la cuisson de viande provenant de femelles sont plus importantes que pour celle provenant de mâles.

Différents auteurs ont envisagé l'influence de l'âge des animaux sur les pertes de poids à la cuisson. SCHMIDT *et al.* (1970) trouvent que les pertes de poids sont plus importantes pour la viande de veaux de 3 à 6 mois que pour de la viande d'animaux de 12 à 20 mois ou de 5 ans. BOUTON et HARRIS (1972) observent au contraire des pertes plus importantes avec de la viande de bœuf de 2 ou 3 ans qu'avec de la viande de veau de 2 mois, mais la viande de ces derniers contient plus de jus exprimable et les pertes totales (pertes à la cuisson plus jus exprimable) sont analogues (fig. 3). TOURAILLE (1977) obtient, dans le cas du poulet, une augmentation des pertes de poids avec l'âge de l'animal. JEREMIAH *et al.* (1971) mettent en évidence une corrélation positive faible mais hautement significative entre l'âge et les pertes de poids à la cuisson de viande de mouton.

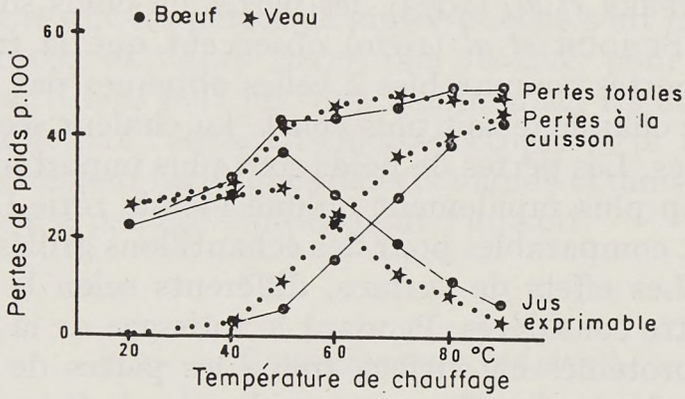


FIG. 3. — *Comparaison des pertes de poids à la cuisson et des quantités de jus exprimable entre des veaux et des bœufs de 2-3 ans.* D'après BOUTON *et al.* (1972).

BRAMBLETT *et al.* (1971) indiquent que la viande d'animaux de race Hereford présente des pertes de poids à la cuisson supérieures à celles d'animaux croisés Charolais × Hereford, mais ces auteurs n'indiquent pas la part du gras dans les pertes de poids. Pour NORRIS *et al.* (1971), l'état d'engraissement modifie la teneur en eau mais n'influe pas de façon significative sur les pertes de poids à la cuisson. Selon SMITH *et al.* (1976), les pertes de poids à la cuisson de viande de mouton augmentent avec l'épaisseur du gras de couverture, ce qui peut être expliqué par une augmentation de la perte de gras. Dans le cas de la viande de bœuf, WOOLSEY et PAUL (1969, *b*) observent des pertes plus importantes lorsque l'échantillon est cuit avec son gras de couverture que lorsque celui-ci est retiré, et montrent que ces différences ne sont pas dues uniquement à une perte de lipides; en effet la viande cuite sans gras de couverture contient plus d'eau. Dans le cas de la viande hachée, MILLER *et al.* (1968) obtiennent des résultats comparables : ils montrent en effet que la quantité d'eau perdue par rapport à la quantité de protéine augmente

fortement lorsque la teneur en gras augmente. Il faut donc souligner le rôle particulier du gras dans l'augmentation des pertes de poids à la cuisson.

L'alimentation de l'animal (DUBE *et al.*, 1971) ou la supplémentation en vitamine A (BRAMBLETT *et al.*, 1971) n'ont pas d'influence significative sur les pertes de poids à la cuisson. Des différences de teneur en eau peuvent être observées entre muscles (CROSS *et al.*, 1973) et GOUTEFONGEA (1968) a montré qu'il existait une relation entre la teneur en cendres d'une part et le pouvoir de rétention d'eau et le pH d'autre part. Il faut également noter, dans les muscles riches en collagène et lorsque les conditions de cuisson le permettent, qu'une partie de l'eau rendue disponible par l'action de la chaleur peut participer à la gélatinisation du collagène.

2.2. — *Influence du pH*

Le pH a une influence importante sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande (fig. 4) et le chauffage modifie le pH de la viande (fig. 5) (HAMM et DEATHERAGE, 1960). En effet, le pouvoir de rétention d'eau de la viande est dû principalement aux protéines myofibrillaires. L'eau est retenue sur les charges électriques des

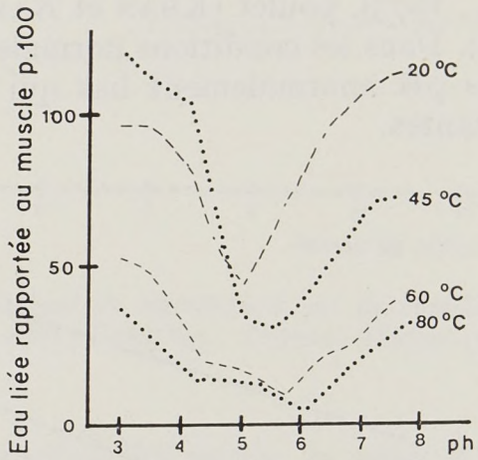


FIG. 4. — *Influence du pH sur le pouvoir de rétention d'eau de viande de bovins chauffée à différentes températures.* D'après HAMM et DEATHERAGE (1960).

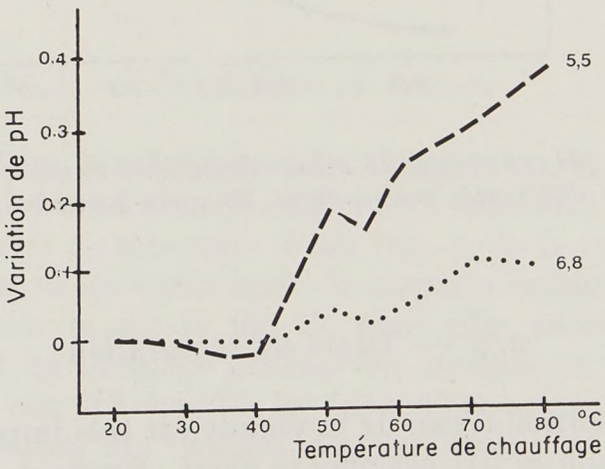


FIG. 5. — *Influence de la température de chauffage sur le pH de viande de bovins ayant un pH initial de 5,5 ou de 6,8.* D'après HAMM et DEATHERAGE (1960).

protéines mais aussi par effet stérique dans le réseau myofibrillaire. Lorsque le pH de la viande s'éloigne de la zone de pH isoélectrique (environ 5,3), la charge nette des protéines augmente et les fibres s'écartent les unes des autres, emprisonnant de la sorte une quantité plus importante d'eau.

Dans le cas du porc, viande la plus transformée industriellement, des différences importantes sont observées en ce qui concerne la rétention d'eau (MONIN, 1976). Les pertes de poids sont moins importantes chez les animaux normaux que chez les animaux PSE (pâle, soft, exsudative) (KEMP *et al.*, 1976). BENNET *et al.*, (1973) observent que les pertes de poids sont plus importantes chez les animaux PSE que chez les normaux et qu'elles sont les plus faibles avec la viande d'animaux DFD (dark, firm, dry). Les différences ne sont pas significatives dans le cas de fritures, mais elles le sont dans le cas de cuissons au four. Dans les deux cas, les pertes de poids sont reliées au pH, dont les valeurs anormales sont la conséquence des traitements subis immédiatement avant l'abattage des animaux particulièrement sensibles. Le même phénomène peut être observé chez les bovins présentant une viande à coupe sombre.

Pour obtenir des pH extrêmes, certains auteurs utilisent des injections d'adrénaline (pH élevés) ou de tranquillisant (pH bas) dans les heures précédant l'abattage des animaux (BOUTON *et al.*, 1971). Les pertes de poids à la cuisson diminuent lorsque le pH augmente quelle que soit l'espèce, porc (BENNET *et al.*, 1973), bœuf (BOUTON *et al.*, 1973), poulet (KHAN et NAKAMURA, 1971) ou mouton (BOUTON *et al.*, 1972, fig. 6). Dans les conditions normales d'abattage, la viande de veau présente souvent des pH anormalement bas qui entraînent des pertes de poids à la cuisson importantes.

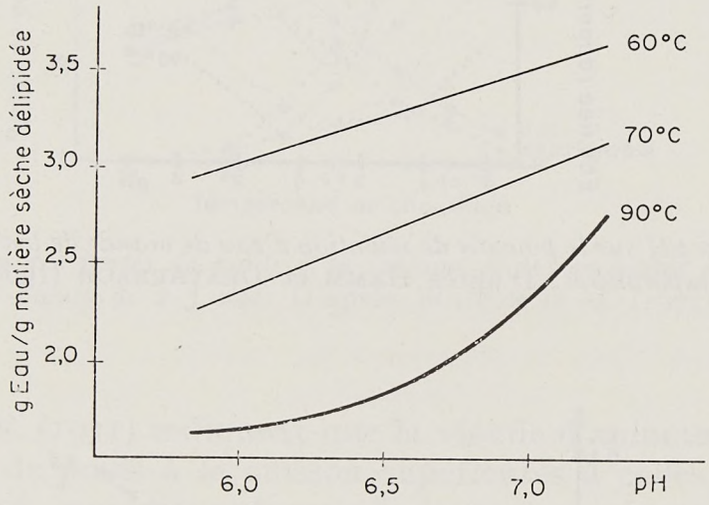


FIG. 6. — *Influence du pH sur la quantité d'eau retenue après cuisson de muscle* longissimus dorsi *de mouton à différentes températures.* D'après BOUTON *et al.* (1972).

2.3. — *Degré de maturation*

Le pouvoir de rétention d'eau de la viande est très important immédiatement après l'abattage, lorsque le pH est encore élevé. Pendant la phase d'installation de la *rigor mortis*, le pH et le pouvoir de rétention d'eau (fig. 7) diminuent et ils augmentent ensuite légèrement au cours de la maturation (HAMM, 1960).

Si après une conservation de 2 à 9 jours, on réajuste le pH à la valeur du pH 1 heure *post mortem*, la viande ne présente pas l'hydratation initiale (HAMM, 1956). GOUTEFONGEA (1969) explique cette variation par des modifications des protéines survenant pendant les 24 heures suivant l'abattage et souligne que la différence est plus importante chez les porcs PSE que chez les animaux normaux, pour lesquels les modifications des protéines seraient donc moins importantes.

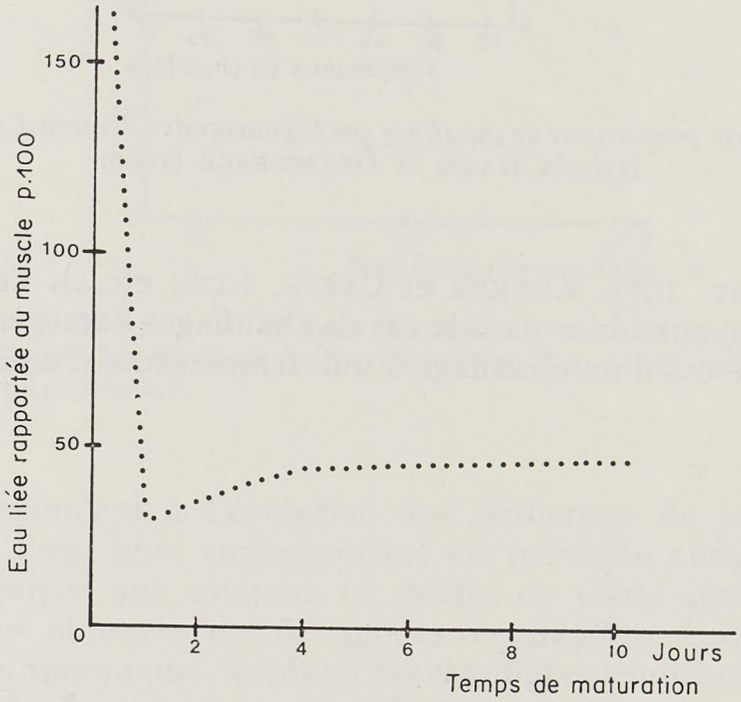


FIG. 7. — *Évolution du pouvoir de rétention d'eau de viande de bovins en fonction du temps après l'abattage.* D'après HAMM (1960).

CIA et MARSH (1976) étudient les pertes de poids d'échantillons cuits avant l'installation de la rigidité cadavérique. Ils observent que les pertes de poids, principalement dans le cas d'un chauffage par micro-ondes, augmentent dans les heures qui suivent l'abattage, tandis que le pH diminue. Ces résultats suivent donc la variation du pouvoir de rétention d'eau.

2.4. — *Conditions de cuisson*

Sous l'effet de la chaleur, la solubilité et les charges des protéines, et par conséquent leur hydratation, sont modifiées (HAMM et DEATHERAGE, 1960) et il en résulte une modification du pouvoir de rétention d'eau (fig. 8) de la viande. HAMM (1966) observe des différences entre les isothermes de sorption uniquement pour le troisième niveau d'hydratation (*c* sur la fig. 1), mais plus récemment IGLESIAS et CHIRIFE (1976) observent un décalage général des isothermes de sorption lorsque la température à laquelle ont été chauffés les échantillons augmente, ce qui correspond bien à une modification des charges des protéines.

Le pouvoir de rétention d'eau de la viande diminue lorsque la température de chauffage augmente et dans ces conditions de nombreux auteurs rapportent une augmentation des pertes de poids (SCHMIDT *et al.*, 1970; SHAFFER *et al.*, 1973;

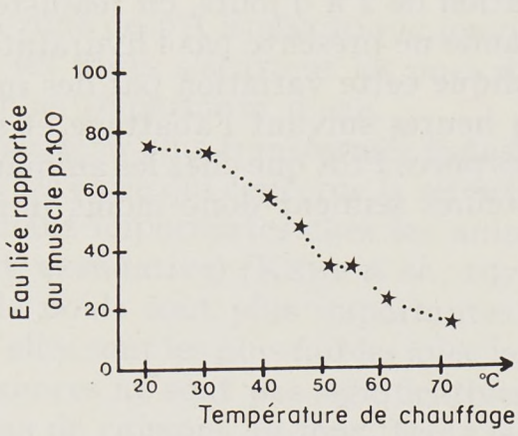


FIG. 8. — *Influence de la température de chauffage sur le pouvoir de rétention d'eau de viande de bovins*
D'après HAMM et DEATHERAGE (1960)

BATCHER et DEARY, 1975; LOCKER et CARSE, 1976; etc...). Cette augmentation est observée (fig. 9) aussi bien dans le cas de chauffages homogènes (BOUTON *et al.*, 1976*b*) que dans le cas d'un chauffage à une température à cœur donnée (ACTON, 1972*b*).

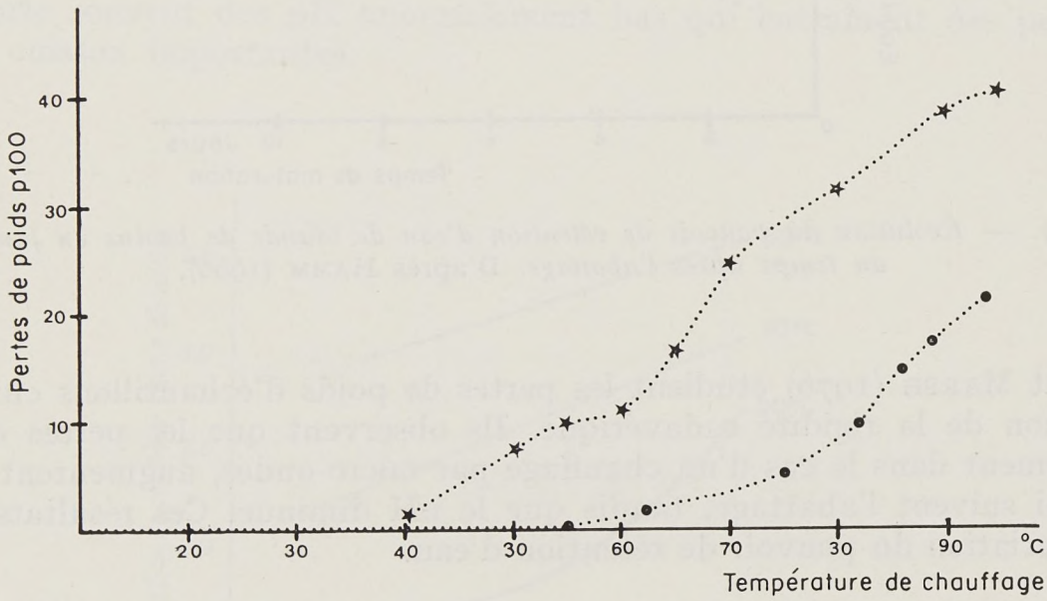


FIG. 9. — *Pertes de poids en fonction de la température de chauffage. Étoiles : viande de veaux chauffée pendant 1 heure à la température donnée; courbe tracée d'après les résultats de* BOUTON *et al.* (1976*b*). *Cercles : viande de poulet chauffée jusqu'à la température à cœur dans un four à 176 °C*; courbe tracée d'après les résultats de ACTON (1972*b*).

Certains auteurs ont étudié la répartition entre « eau libre » et « eau liée » en fonction de la température de chauffage (fig. 10). Si RITCHEY et HOSTETLER (1964) ne trouvent qu'une faible variation principalement entre 74 et 80 °C pour l'eau libre, SANDERSON et VAIL (1963), ainsi que BOUTON et HARRIS (1972) observent une diminution importante de l'eau libre dans les échantillons, l'eau liée restant pratiquement constante par rapport à la matière sèche de l'échantillon. Ces équipes utilisent des méthodes différentes d'estimation, donc de définition, de l'eau libre, ce qui explique la différence des valeurs obtenues. Les résultats de SANDERSON et

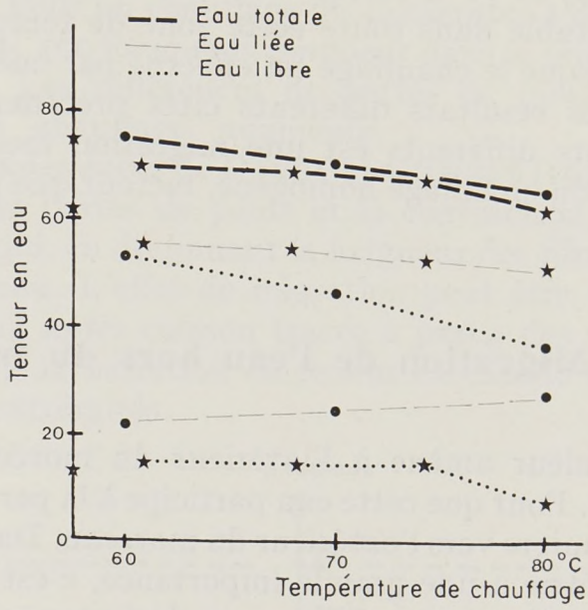


FIG. 10. — *Évolution de l'eau libre et de l'eau liée en fonction de la température de chauffage.* Courbes tracées d'après les résultats de SANDERSON et VAIL (1963) (cercles) et de RICHTEY et HOSTETLER (1964) (étoiles).

VAIL (1963) correspondent à l'évolution des isothermes de sorption rapportée par HAMM (1966), l'eau libre correspondant au troisième niveau d'hydratation.

Différentes équipes ont comparé les pertes de poids après chauffages par micro-ondes à celles obtenues par des modes de chauffage traditionnels. S'il est difficile, sur un plan thermique, de définir les chauffages traditionnels, compte tenu de l'hétérogénéité du traitement, cette définition est encore plus délicate dans le cas des chauffages par micro-ondes. En effet, si l'on peut considérer en première approximation que le traitement est homogène dans l'ensemble du morceau, il n'est pas possible de contrôler les conditions de température de façon précise, les conditions de cuisson ne pouvant être constatées qu'à posteriori. En ce qui concerne les pertes de poids, DEETHARDT *et al.* (1973) trouvent des pertes de poids comparables, JANICKI et APPLEDORF (1974) et BALDWIN *et al.* (1976) obtiennent pour leur part des pertes supérieures dans le cas des chauffages par micro-ondes, ces différences étant probablement dues à des conditions différentes de chauffage. ROBERTS et LAWRIE (1974) (fig. 11) observent une diminution du pouvoir de rétention d'eau

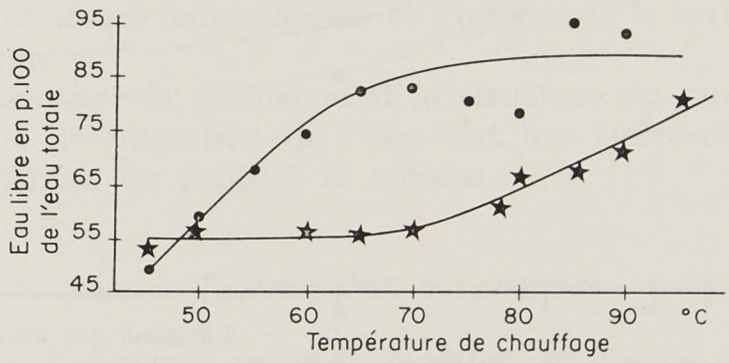


FIG. 11. — *Variation du pouvoir de rétention d'eau de muscle* longissimus dorsi *de bovins en fonction de la température pour des chauffages conventionnels (cercles) ou par micro-ondes (étoiles).* D'après ROBERTS et LAWRIE (1974).

des myofibrilles entre 45 et 70 °C lorsqu'elles sont chauffées de façon conventionnelle alors qu'il reste stable dans toute cette zone de température et ne diminue qu'à partir de 70 °C lorsque le chauffage est effectué par micro-ondes, ceci pouvant également expliquer les résultats différents cités précédemment. Une troisième explication des résultats différents est une migration facilitée de l'eau hors du morceau, compte tenu du chauffage homogène, facteur que nous allons maintenant considérer.

III. — Migration de l'eau hors du morceau

L'action de la chaleur amène à l'intérieur du morceau la libération d'une certaine quantité d'eau. Pour que cette eau participe à la perte de poids à la cuisson, il est nécessaire qu'elle migre vers l'extérieur du morceau. Dans tous les phénomènes de migration, la géométrie a une grande importance, c'est pourquoi nous envisagerons ce facteur avant d'envisager l'influence de facteurs liés à l'abattage et des conditions de cuisson.

3.1. — *Géométrie des morceaux*

Ce facteur, bien qu'extrêmement important, est rarement signalé dans les articles faisant mention de pertes de poids. LOCKER et DAINES (1974*a*) étudient les pertes de poids du muscle *Sternomandibularis* après des cuissons de 40 minutes à 80 °C pour des longueurs de fibres comprises entre 1 et 16 cm, les autres dimensions restant constantes. Ils trouvent que les pertes de poids diminuent de 42 p. 100 pour 1 cm à 17 p. 100 pour 16 cm dans le sens des fibres (fig. 12) et selon eux les pertes par les surfaces parallèles aux fibres sont négligeables. Les différences observées peuvent néanmoins avoir en partie pour origine les différences de volume, donc de traitement thermique subi par les échantillons. Cette critique ne peut plus être formulée dans le cas des expériences de BOUTON *et al.* (1976*a*). Ces auteurs

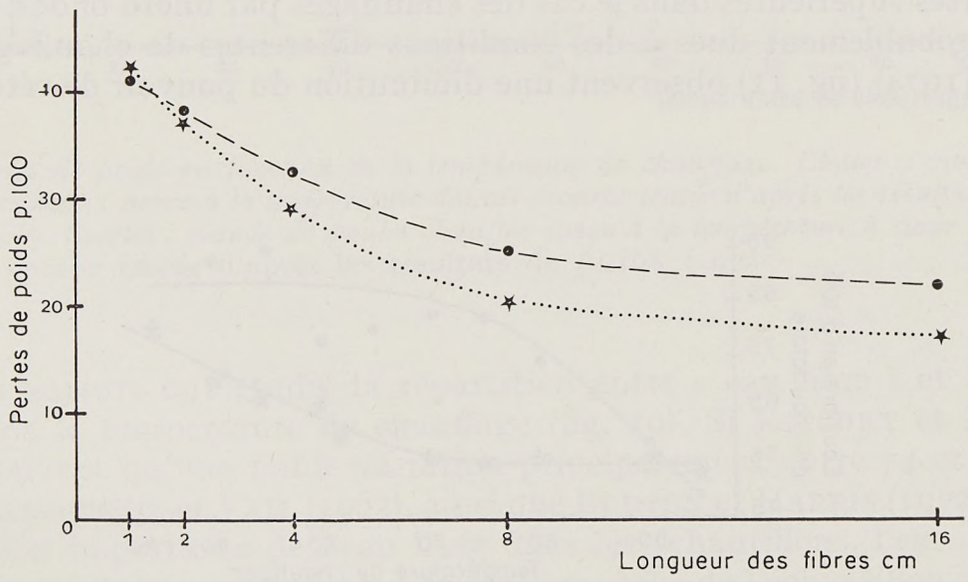


FIG. 12. — *Pertes de poids à la cuisson en fonction de la longueur de l'échantillon dans le sens des fibres. Étoiles : frais. Cercles : viande ayant subie un cycle congélation-décongélation.* Courbes tracées d'après les résultats de LOCKER et DAINES (1974*a*).

ont étudié les pertes de poids d'échantillons parallélépipédiques de mêmes dimensions (6 × 4 × 2 cm). Pour un chauffage de 40 minutes à 80 °C, les pertes de poids étaient de 29, 32 et 36 p. 100 lorsque la longueur dans le sens des fibres était 6, 4 et 2 cm respectivement. Les différences de pertes de poids observées diminuent lorsque le temps de chauffage augmente.

D'autre part, les expériences de DAVEY et GILBERT (1974) mettent en évidence le parallélisme entre les pertes de poids et la contraction des fibres musculaires en cours de chauffage, qui, en diminuant la longueur des fibres, facilite la migration de l'eau hors du morceau. L'effet de migration peut être mis en évidence par la courbe de teneur en eau après cuisson tracée à partir des résultats de LOCKER et DAINES (1974*a*, fig. 13), la variation de teneur en eau de l'échantillon cuit est la plus importante aux extrémités.

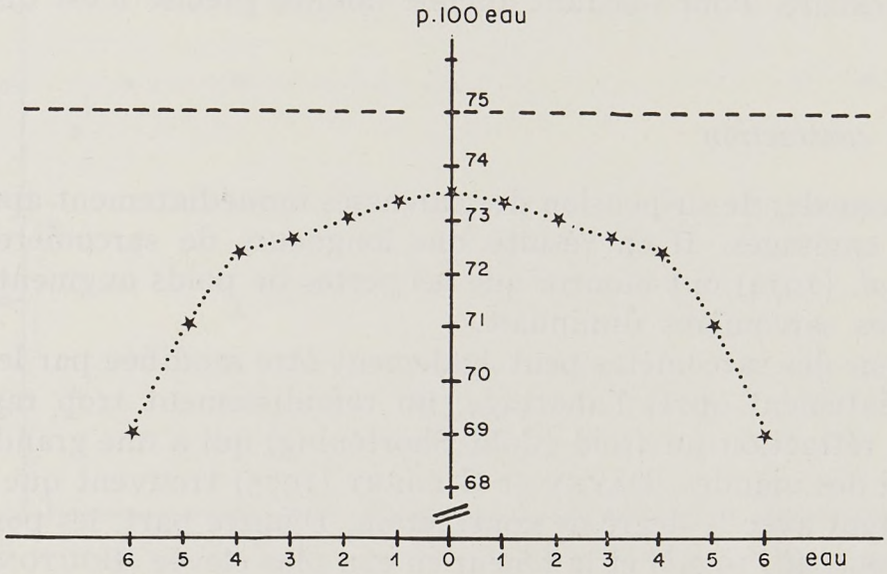


FIG. 13. — *Teneur en eau après une cuisson de 40 minutes à 80 °C en fonction de la distance, dans le sens des fibres, au centre de l'échantillon. L'échantillon cru mesurait 16 cm dans le sens des fibres.* Courbe tracée d'après les résultats de LOCKER et DAINES (1974*a*).

En utilisant la viande hachée, LOCKER et DAINES (1974*a* et *b*) observent des pertes de poids correspondant à celles obtenues avec des longueurs de fibres comprises entre 2 et 4 cm. Dans le cas du broyat de poulet, ACTON (1972*a*) observe que les pertes de poids diminuent avec la taille des particules et que parallèlement la force de liaison entre les fragments augmente. Il met également en évidence une augmentation de la quantité de protéines extractibles en milieu salin. Nous pouvons donc penser que, dans le cas de la viande hachée, le broyage crée une nouvelle structure dans laquelle la coagulation des protéines libérées entre les différents fragments assure leur cohésion et s'oppose de la sorte à la diffusion du jus hors du morceau.

Il apparaît donc que la géométrie et la structure du morceau, intervenant dans le phénomène de migration de l'eau, ont une influence considérable sur l'importance des pertes de poids à la cuisson.

3.2. — *Facteurs liés à l'abattage*

Les conditions d'abattage peuvent modifier la qualité de la viande (MAC FARLANE *et al.*, 1974). Le transport et les conditions auxquelles les animaux sont soumis immédiatement avant l'abattage peuvent avoir des répercussions sur le pH,

le mode de refroidissement et de suspension des carcasses sur la longueur des sarcomères et nous devrons considérer également le temps de maturation.

3.2.1. *Influence du pH*

Nous avons déjà envisagé (§ 2.2) l'influence du pH sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande. L'augmentation du nombre de charges des protéines amène un gonflement du réseau myofibrillaire qui, après cuisson, retient une partie importante de l'eau par effet stérique, et les pertes de poids sont moins importantes. Cependant, compte tenu des résultats de HAMM et DEATHERAGE (1960) sur les pertes de matière sèche en fonction du pH, il semblerait que si l'eau migre plus difficilement, la diffusion de matière sèche soit favorisée par un gonflement du réseau myofibrillaire. Pour l'instant aucune donnée précise n'est disponible dans ce domaine.

3.2.2. *État de contraction*

Différents modes de suspension des carcasses immédiatement après l'abattage peuvent être envisagés. Il en résulte des longueurs de sarcomères différentes, et BOUTON *et al.* (1974) ont montré que les pertes de poids augmentaient lorsque la longueur des sarcomères diminuait.

La longueur des sarcomères peut également être modifiée par le régime thermique immédiatement après l'abattage, un refoidissement trop rapide pouvant entraîner une rétraction au froid (Cold Shortening) qui a une grande importance pour la dureté des viandes. DAVEY et GILBERT (1975) trouvent que les pertes de poids augmentent avec le degré de contraction. D'autre part, les pertes sont plus faibles (BOUTON *et al.*, 1975*b*) et la teneur en eau plus élevée (BOUTON *et al.*, 1976*c*) lorsque le muscle a été étiré.

Cette relation entre les pertes de poids et la longueur des sarcomères n'a pas été mise en évidence par tous les auteurs. LOCKER et DAINES (1974*b*, 1975, 1976) n'observent pas de différences marquées de pertes de poids que le muscle soit contracté ou non. Ces résultats différents s'expliquent par la méthode de préparation des échantillons utilisés. Dans les études précédemment citées, la contraction était mesurée, puis les échantillons étaient soumis à la cuisson. Pour leur part, LOCKER et DAINES après avoir mesuré la contraction découpent dans les muscles des échantillons de géométrie donnée qu'ils soumettent ensuite à l'action de la chaleur. Les morceaux ont donc avant chauffage, la même longueur dans le sens des fibres et nous avons vu que cette longueur a une grande influence sur les pertes de poids à la cuisson. Il apparaît donc que la longueur des sarcomères n'agit pas directement, mais par des modifications des dimensions des morceaux, sur les pertes de poids à la cuisson.

3.2.3. *Degré de maturation*

Le degré de maturation (§ 2.3) intervient sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande. BOUTON *et al.* (1975*a*, 1975*d*) comparent les pertes de poids d'échantillons cuits 24 heures après l'abattage et maturés pendant 3 semaines à 0 + 1 °C et observent que la viande maturée a des pertes de poids très supérieures à la viande en *rigor*, alors que le pouvoir de rétention d'eau augmente légèrement (fig. 7). Les modifications de la structure au cours de la maturation peuvent expliquer l'augmentation des pertes de poids.

3.3. — *Conditions de cuisson*

Les conditions de cuisson influent sur la migration de l'eau hors du morceau, principalement par le temps de chauffage. Pour des chauffages à 80 °C les pertes de poids augmentent avec le temps de cuisson (LOCKER et DAINES, 1974*b*). La cinétique des pertes de poids dépend également de la température de chauffage qui modifie la structure de la viande. Plus la température est élevée et plus la structure est altérée, ce qui explique que les pertes sont plus progressives pour les températures de chauffage modérées (BOUTON *et al.*, 1975*a*, fig. 14).

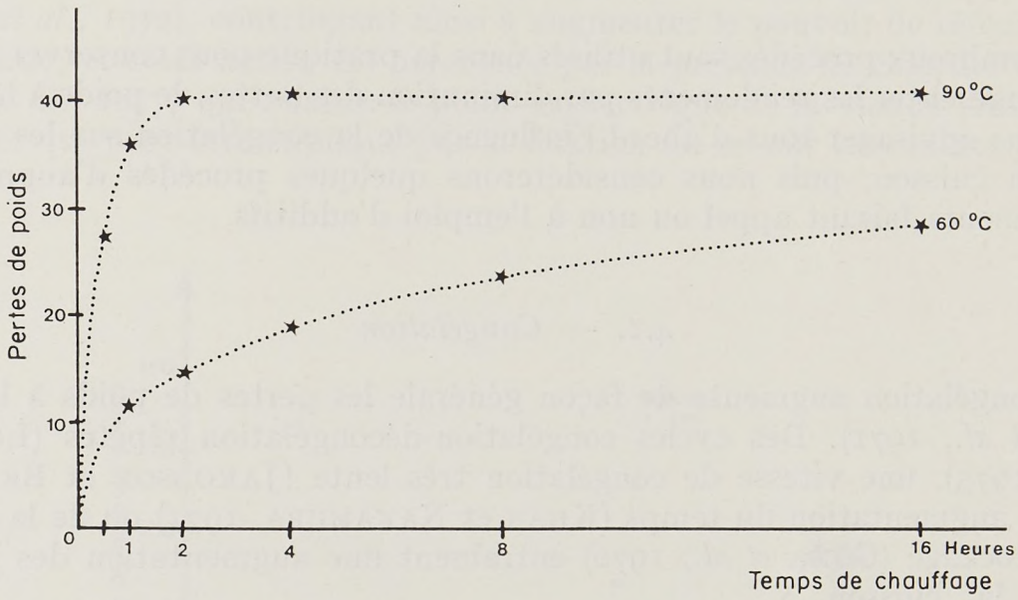


FIG. 14. — *Pertes de poids à la cuisson de muscle* semitendinosus *de bovins en fonction du temps de chauffage à 60 et à 90 °C.* Courbes tracées d'après les résultats de BOUTON *et al.* (1975*a*).

La figure 9 représente deux courbes de pertes de poids à la cuisson en fonction de la température de chauffage. Pour ACTON (1972*b*), qui considère la température à cœur de l'échantillon, dans des conditions telles qu'il faille 30 minutes pour atteindre 94 °C à cœur ces pertes ne sont sensibles qu'à partir de 60 °C, alors que pour BOUTON *et al.* (1976*b*) qui chauffent pendant une heure à la température considérée, les pertes sont déjà décelables à 40 °C. Dès 40 °C, le pouvoir de rétention d'eau de la viande est modifié (fig. 8) et une certaine quantité d'eau est donc susceptible de migrer hors du morceau si les conditions de chauffage lui en laissent le temps, ce qui est le cas dans les expériences de BOUTON *et al.* (1976*b*) mais ne l'est pas dans celles de ACTON (1972*b*), ce qui explique que ce dernier obtienne des pertes très inférieures.

Nous avons vu (§ 1.3) que certains auteurs envisageaient des vitesses de chauffage différentes en faisant varier la température du four et que, selon les cas, le temps ou la température de chauffage en surface avait un caractère prépondérant, LOCKER et DAINES (1974*b*) obtiennent pour leur part des vitesses de chauffage différentes en immergeant d'une part des échantillons dans un bain à 80 °C et d'autre part dans un bain à 30 °C chauffé progressivement jusqu'à 80 °C. Ils n'observent pas de différences significatives pour le muscle *Rectus abdominis*, mais le muscle *Sternomandibularis* présente des pertes de poids plus importantes au cours du chauffage lent. La quantité d'eau pouvant migrer est libérée progres-

sivement et peut migrer lorsque la température du chauffage augmente, ce qui peut expliquer les résultats comparables obtenus avec le muscle *Rectus abdominis*, mais aucune explication ne peut être fournie pour expliquer les résultats obtenus avec le muscle *Sternomandibularis*.

Nous pourrions également envisager une influence du mode de chauffage sur la migration de l'eau hors du morceau compte tenu des caractéristiques de coagulation des protéines à la surface de l'échantillon, mais dans ce domaine, si des informations sont disponibles dans les ouvrages culinaires, il n'existe pas de données dans la littérature scientifique.

IV. — Quelques procédés technologiques

De nombreux procédés sont utilisés dans la pratique pour conserver la viande ou pour augmenter les rendements par diminution des pertes de poids à la cuisson. Nous allons envisager tout d'abord l'influence de la congélation sur les pertes de poids à la cuisson, puis nous considérerons quelques procédés d'augmentation des rendements faisant appel ou non à l'emploi d'additifs.

4.1. — *Congélation*

La congélation augmente de façon générale les pertes de poids à la cuisson (Berry *et al.*, 1971). Des cycles congélation-décongélation répétés (Locker et Daines, 1973), une vitesse de congélation très lente (Jakobson et Bengtsson, 1973) une augmentation du temps (Khan et Nakamura, 1971) ou de la température de stockage (Goma *et al.*, 1970) entraînent une augmentation des pertes de poids à la cuisson.

Selon Bengtsson *et al.* (1976), les pertes de poids sont plus importantes lorsque la cuisson est effectuée directement à partir de la viande congelée (voir fig. 2). Roberts *et al.* (1976) observent, sur des échantillons préalablement soumis à l'action de la pression, que les pertes de poids sont plus importantes pour les morceaux décongelés à 24 °C et les plus faibles pour ceux décongelés à + 1 °C, les échantillons cuits à l'état congelé ayant des pertes intermédiaires. Ces résultats différents peuvent avoir pour origine les conditions de congélation ou de cuisson différentes ainsi que la pression exercée sur certains échantillons.

Locker et Daines (1974*a*) ont étudié l'influence de la longueur des fibres sur les pertes de poids à la cuisson (fig. 12). Ils montrent que, si la viande qui a été congelée perd plus à la cuisson que la viande fraîche, la différence diminue jusqu'à s'annuler lorsque la longueur des fibres diminue. Il apparaît donc que la congélation favorise la migration de l'eau hors de la viande. Pendant la congélation, suivant les conditions, des cristaux de glace peuvent altérer la structure musculaire (Goma *et al.*, 1970). Après décongélation, ces altérations permettent une migration plus rapide de l'eau hors du morceau.

4.2. — *Emploi d'additifs*

Il ne s'agit pas ici de considérer tous les additifs utilisables, mais plutôt le mode d'action de certains d'entre eux. Bien qu'il s'agisse d'additifs récents et encore peu utilisés, nous allons envisager tout d'abord l'incorporation de protéines végétales texturées avant de considérer l'action des additifs « traditionnels ».

Les conséquences de l'incorporation de protéines végétales texturées sur les pertes de poids à la cuisson dépendent de la source de protéines utilisées. S'il s'agit de protéines de coton, elles n'influent pas sur les pertes de poids (MOLONON et BOWERS, 1976) mais des protéines de soja augmentent la rétention d'eau (ANDERSON et LIND, 1975). Ces différences peuvent avoir pour origine l'affinité de chacune de ces protéines pour l'eau qui fait qu'elles en immobilisent des quantités différentes et peuvent de la sorte empêcher la migration de l'eau relarguée hors du morceau.

Différents sels peuvent entraîner une diminution des pertes de poids à la cuisson (DRIVER et VENKATA-RAMAN, 1976). Les plus employés, après le chlorure de sodium, sont les polyphosphates (SHULTS *et al.*, 1972) utilisés en association avec d'autres sels (COHEN *et al.*, 1977) ou des sucres (JACQUET *et al.*, 1975). L'action des polyphosphates est double. D'une part ils entraînent une élévation du pH (SHULTS *et al.*, 1972), contribuant ainsi à augmenter le pouvoir de rétention d'eau de la viande, et cette action est accentuée par la présence de chlorure de sodium (COHEN *et al.*, 1977) qui abaisse le point isoélectrique de la viande (HAMM, 1960; fig. 15), ce qui peut être expliqué par la fixation du sel sur les chaînes protéiques

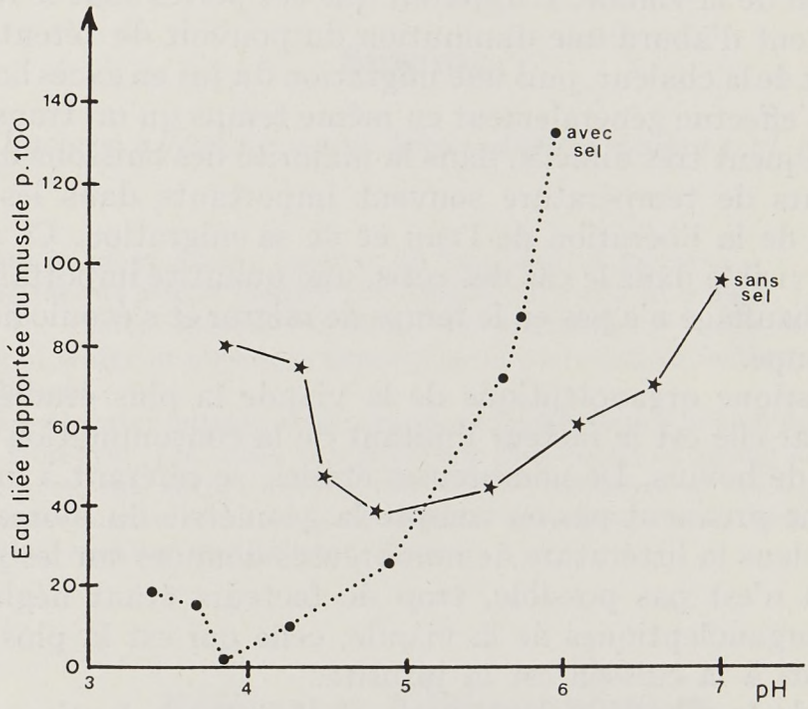


FIG. 15. — *Influence du sel sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande. Étoiles : témoin; Cercles : salé à 2 p. 100 de NaCl.* D'après HAMM (1960).

(HAMM, 1962*a*) et les mêmes différences sont observées après cuisson (HELLENDOORN, 1962). D'autre part, en complexant les ions divalents présents dans le muscle, ils permettent un gonflement de la structure myofibrillaire qui s'oppose à la migration de l'eau. L'action de complexants du calcium (HAMM, 1956) augmente l'hydratation et l'addition d'E.D.T.A. ou de polyphosphate à de la viande de porc avant lyophilisation augmente la réhydratation et diminue les pertes de poids au cours d'une cuisson ultérieure, l'E.D.T.A. facilite la diffusion de l'eau dans la structure en complexant les ions calcium et magnésium présents (WISMER-PEDERSEN, 1965). Parallèlement, WIERBICKI *et al.* (1963) montrent qu'une addition de calcium diminue l'hydratation de la viande.

Il est également possible de diminuer les pertes de poids à la cuisson par abaissement du pH au-dessous du pH isoélectrique de la viande. Ceci peut être obtenu par une marinade dans de l'acide acétique, traitement qui a une influence bénéfique sur la tendreté, récemment chiffrée par WENHAM et LOCKER (1976).

4.3. — *Saumurage à chaud*

Pour bénéficier du fort pouvoir de rétention d'eau et de la structure particulière du muscle immédiatement après l'abattage, la viande peut être broyée et saumurée dans les heures suivant la mort (HAMM, 1960). Un procédé de ce type est également applicable pour le jambon cuit (GOUTEFONGEA et SCHIMANN, 1973).

Conclusion

Nous avons examiné l'influence de différents facteurs sur les pertes de poids pendant la cuisson de la viande. Il apparaît que ces pertes sont le résultat de deux types d'action. Tout d'abord une diminution du pouvoir de rétention d'eau de la viande sous l'effet de la chaleur, puis une migration du jus en excès hors du morceau. Cette migration s'effectue généralement en même temps qu'un transfert de chaleur et il est par conséquent très difficile, dans la majorité des cuissons usuelles, compte tenu des gradients de température souvent importants dans les morceaux, de séparer les effets de la libération de l'eau et de sa migration. Ce phénomène est particulièrement visible dans le cas des rôtis, une quantité importante de jus qui a été libéré par le chauffage n'a pas eu le temps de migrer et s'écoule hors du morceau lorsqu'on le découpe.

La caractéristique organoleptique de la viande la plus étudiée actuellement est la tendreté, car elle est le facteur limitant de la consommation des viandes de quartier avants de bovins. De nombreuses études, se référant à une température à cœur donnée, ne prennent pas en compte la géométrie du morceau. De ce fait, si l'on rencontre dans la littérature de nombreuses données sur les pertes de poids, leur comparaison n'est pas possible, trop de facteurs étant négligés. Parmi les caractéristiques organoleptiques de la viande, celle qui est la plus influencée par les pertes de poids à la cuisson est la jutosité.

La jutosité de la viande a deux composantes organoleptiques. La première est l'impression d'humidité pendant les quelques premières mastications. Elle est produite par une libération rapide du liquide disponible dans la viande. La seconde est l'impression de jutosité soutenue, largement due à l'aspect stimulant des gras sur la salivation (LAWRIE, 1974). Il faut noter également qu'il existe des interférences entre les sensations de tendreté et de jutosité (HORSFIELD et TAYLOR, 1976) et que, pour une même viande, les appréciations de jutosité varient suivant que la dégustation est effectuée avec de la viande chaude ou froide (HARRIES *et al.*, 1972).

Pour un même muscle, la jutosité diminue de façon importante lorsque la température de cuisson à cœur augmente (RITCNEY, 1965). CROSS *et al.* (1973) trouvent une corrélation lâche mais significative entre la jutosité et la teneur en eau. Selon ASGHAR et YEATES (1977), les concentrations en groupes cationiques, en cendres et en stroma acido-soluble seraient également reliées à la jutosité.

JEREMIAH *et al.* (1971), ainsi que KEMP *et al.* (1976) envisagent la relation entre les pertes de poids à la cuisson et la jutosité. Ces deux équipes obtiennent un

coefficient de corrélation de — 0,49. BOUTON *et al.* (1975*c*) comparent différentes méthodes objectives d'estimation de la jutosité. Pour un type de muscle et une cuisson donnée, ils obtiennent le coefficient de corrélation le plus élevé (0,92) avec les pertes de poids à la cuisson. La comparaison des coefficients de corrélation montre bien que d'autres facteurs que les pertes de poids interviennent dans la sensation de jutosité et qu'il ne faut comparer que des travaux effectués dans des conditions analogues.

Si un certain nombre de données sont disponibles en ce qui concerne les facteur influençant le pouvoir de rétention d'eau de la viande, il n'en est pas de même en ce qui concerne l'influence de la structure sur la composition et la diffusion du jus hors du morceau. Il est nécessaire de pouvoir différencier l'influence du traitement thermique de celle des conditions de migration. C'est dans ce domaine que des recherches devraient être effectuées pour permettre une meilleure compréhension des phénomènes de pertes de poids pendant la cuisson de la viande, ainsi que sur les pertes de gras et les phénomènes de transfert et de changement de phase se rattachant aux traitements thermiques.

Reçu pour publication en juin 1978

Summary

Factors affecting water losses during cooking of meat

Weight losses in meat during cooking on two kind of factors.

— First, the factors which modify the binding of water in muscle.

— Second, the factors which determine the migration of water outside of the sample.

The binding of water in muscle is depending on zootechnical factors, pH, degree of ageing and cooking conditions.

The migration of water outside of the sample is mainly depending on its shape and geometric characteristics. Moreover, pH, state of contraction and degree of ageing have to be considered.

In the first part, the author studies the relative influence of these factors and then, he emphasizes the consequence of some technological treatments and the relationships between weight losses during cooking and juicines of meat.

Références bibliographiques

ACTON J. C., 1972*a*. The effect of meat particle size on extractable protein, cooking loss and binding strenght in chicken loaves. *J. Food Sci.*, **37**, 240-243.

ACTON J. C., 1972*b*. Effect of heat processing on extractability of salt soluble protein, tissue binding strength and cooking loss in poultry meat loaves. *J. Food Sci.*, **37**, 244-246.

ANDERSON D. B., BREIDENSTEIN B. B., KAUFFMAN R. G., CASSENS R. G., BRAY R. W., 1971. Effect of cooking on fatty acid composition of beef lipids. *J. Fd. Technol.*, **6**, 141-152.

ANDERSON R. H., LIND K. D., 1975. Retention of water and fat in cooked patties of beef and of beef extended with textured vegetable protein. *Food Technol.*, **29**, feb. 1975, p. 44-45.

ANDROSS M., 1949. *Brit. J. Nutr.*, **3**, 396, cité par LAWRIE (1974).

ASGHAR A., YEATES N. T. M., 1977. Correlations between physicochemical and organoleptic characteristics of lamb L. dorsi muscle. *J. Sci. Fd Agric.*, **28**, 1-10.

BALDWIN R. E., KORSCHGEN B. M., RUSSEL M. S., MABESA L., 1976. Proximate analysis, free amino acid, vitamine and mineral content of microwave cooked meat. *J. Food Sci.*, **41**, 762-765.

BATCHER O. M., DEARY P. A., 1975. Quality characteristics of broiled and roasted beef steacks. *J. Food Sci.*, **40**, 745-746.

BAYNE B. H., STRAWN S. S., HUTTON C. W., BACKUS W. R., MEYER B. H., 1972, Relationship of alkali and ringer insoluble collagen to tenderness of beef heated at two rates. *J. animal Sci.*, **33**, 958-962.

BELTON P. S., JACKSON R. R., PACKER K. J., 1972. Pulsed NMR studies of water in striated muscle. I. Transverse nuclear spin relaxation times and freezing effects. *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 16-25.

BEM Z., LEISTNER L., 1970. Bestimmung der Wasseraktivitat von Fleisch und Fleischwaren mit der Methode von Landrock und Proctor. *Fleischwirtschaft*, 1412-1414.

BENGTSSON N. E., JAKOBSON B., DAGERSKOG M., 1976. Cooking of beef by oven roasting a study of heat and mass transfert. *J. Food Sci.*, **41**, 1047-1053.

BENNETT M. E., BRAMBLETT V. D., ABERLE E. D., HARRINGTON R. B., 1973. Muscle quality, cooking method and aging vs. palatability of pork loin chops. *J. Food Sci.*, **38**, 536-539.

BERRY B. W., SMITH G. C., SPENCER J. V., KROENING G. H., 1971. Effects of freezing method, length of frozen storage and cookery from the thawed or frozen state on palability characteristics of pork. *J. Anim. Sci.*, **32**, 636-640.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1971. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. *J. Food Sci.*, **36**, 435-439.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., 1972. The effects of cooking temperature and time on some mechanical properties of meat. *J. Food Sci.*, **37**, 140-144.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1972. The effects of ultimate pH on ovine muscle: water holding capacity. *J. Food Sci.*, **37**, 351-355.

BOUTON P. E., CARROLL F. D., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1973. Influence of pH and fiber contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. *J. Food Sci.*, **38**, 404-407.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., RATCLIFF D., 1974. Changes in the mechanical properties of veal muscles produced by myofibrillar contraction state, cooking temperature and cooking time. *J. Food Sci.*, **39**, 869-875.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1975*a*. Changes in shear parameters of meat associated with structural changes produced by aging, cooking and myofibrillar contraction. *J. Food. Sci.*, **40**, 1122-1126.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1975*b*. Possible relationships between shear, tensile, and adhesion properties of meat and meat structure. *J. Texture Studies*, **6**, 297-314.

BOUTON P. E., FORD A. L., HARRIS P. V., RATCLIFF D., 1975*c*. Objective assessment of meat juiciness. *J. Food Sci.*, **40**, 884-885.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1975*d*. Peak shear-force values obtained for veal muscle, samples cooked at 50 and 60 °C: influence of aging. *J. Food Sci.*, **41**, 197-198.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1976*a*. Factors influencing cooking losses from meat. *J. Food Sci.*, **41**, 1092-1095.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1976*b*. Dimensional changes in meat during cooking, *J. Texture Studies*, **7**, 179-192.

BOUTON P. E., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1976*c*. Thermal contraction of meat during cooking and its possible influence on tenderness. *J. Texture Studies*, **7**, 193-203.

BRAMBLETT V. D., MARTIN T. G., HARRINGTON R. B., EVANS G. J., 1971. Breed, vitamin A supplementation and position effects on quality characteristics of beef short loin steaks. *J. Anim. Sci.*, **33**, 349-354.

BULL H. B., BREESE K., 1968. Protein hydratation. I. Binding sites *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 488-496.

CAMPBELL A. M., TURKKI P. R., 1967. Lipids of raw and cooked ground beef and pork. *J. Food Sci.*, **32**, 143-146.

CIA G., MARSH B. B., 1976. Properties of beef cooked before rigor orset. *J. Food Sci.*, **41**, 1259-1262.

COHEN J. S., SHULTS G. W., MASON V. C., WIERBICKI E., 1977. Variables affecting the acceptability of radappertized ground beef products. Effects of food grade phosphates, NaCl, fat level and grinding methods. *J. Food Sci.*, **42**, 338-343.

CROSS H. R., CARPENTER Z. L., SMITH G. C., 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *J. Food Sci.*, **38**, 998-1003.

CROSS H. R., STANFIELD, KOCH E. J., 1976. Beef palability as affected by cooking rate and final internal temperature. *J. Anim. Sci.*, **43**, 114-121.

DAVEY C. L., GILBERT K. V., 1974. Temperature dependent cooking toughness in beef. *J. Sci. Fd Agric.*, **25**, 931-938.

DAVEY C. L., GILBERT K. V., 1975. Cold shortening and cooking changes in beef. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 761-767.

DEBROT S., 1974. Pourquoi cuire la viande? *Euroviande*, n° 86, p. 57-61.

DEETHARDT D., COSTELLO W., SCHNHEIDER K. C., 1973. Effect of electronic, convection and conventional oven roasting on the acceptability of pork loin roasts *J. Food Sci.*, **38**, 1076-1077.

DRIVER G. E., VENKATA-RAMAN S., 1976. Effect of processing conditions and additions on the texture of stored freeze-dried beef. *J. Food Sci.*, **41**, 743-747.

DUBE G., BRAMBLETT V. D., HOWARD R. D., HOMLER B. E., JOHNSON H. R., HARRINGTON R. B., JUDGE M. D., 1971. Dietary effects on beef composition. 4. Processing and palability attributes. *J. Food Sci.*, **36**, 147-154.

EVANS G. G., RANKEN M. D., 1975. Fat cooking losses from non emulsified meat products *J. Fd. Technol.*, **10**, 63-71.

GEURTS T. J., WALSTRA P., MULDER H., 1974. Water binding to milk protein with particular reference to cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **28**, 46-72.

GOMA M., GYONOS K., BIRO G., 1970. Zusammenhange zwischen Auftau-Saftverlust, Eigenschaft des Fleisches nach dem Kochen und histologischer Struktur bei gefroren gewesenem Fleisch. *Fleischwirtschaft*, **50**, 1681-1687.

GOUTEFONGEA R., 1960. Description d'un nouvel appareil pour mesurer le pouvoir de rétention d'eau de la viande. VIe Meeting of Meat Research Institutes. Utrecht. 1960.

GOUTEFONGEA R., 1963. Comparaison de différentes méthodes de mesure du pouvoir de rétention d'eau de la viande de Porc. Liaison avec le pH. *Ann. Zootech.*, **12**, 125-132.

GOUTEFONGEA R., 1966. Étude comparative de différentes méthodes de mesure du pouvoir de rétention d'eau de la viande de Porc. *Ann. Zootech.*, **15**, 291-295.

GOUTEFONGEA R., 1968. Relation entre la teneur en potassium, sodium, calcium et magnesium du muscle de porc et certaines caractéristiques physico-chimiques. *Ann. Zootech.*, **17**, 207-211.

GOUTEFONGEA R., 1969. Étude du pouvoir de rétention d'eau de la viande de Porc. 1. Variation en fonction du pH. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 111-116.

GOUTEFONGEA R., SCHIMANN C. 1973. Fabrication du jambon de Paris par saumurage avant *rigor mortis*. XIX. Réunion européenne des chercheurs en viande. Paris, 2-7 septembre 1973, Tome IV. M/4, p. 1691-1701.

GRAU R., HAMM R., 1957. Uber das Wasserbindungsvermoegen des Säeugetiermuskels. II. Mitt. Ueber die Bestimmung der Wasserbindung des Muskels. *Z. Lebens-Untersuch.u.Forsch.*, 105-446.

GUILBOT A., CHARBONNIÈRE R., ABADIE P., GIRARD P., 1960. L'eau de sorption de l'amidon. Étude par spectrologie hertzienne. *Die Stärke*, **12**, 327-332.

HAMM R., 1956. Uber die Wirkung der Adenosintriphosphorsäure auf Hydratation und Rigidität des postmortalen Rindermuskels. *Biochem. Z.*, **328**, 309-322.

HAMM R., 1960. Biochemistry of meat hydratation. Advances in *Food Research*, **10**, 355-463.

HAMM R., 1962*a*. Intermolekular Wirkung in muslularen Eiwei β und ihre Wichtigkeit für die Fixierungeigenschaften des Fleischwassers. *Fleischwirtschaft*, **14**, 958, 961-963.

HAMM R., 1962*b*. Die Wechselwirkung zwischen Muskeleiweiss und Wasser und ihre Bedentung für die kolloidchemischen Eigenschaften des Fleiches. *Fleischwirtschaft*, **14**, 678-680.

HAMM R., 1966. Heating of Muscle Systems. in « the physiology and biochemistry of muscle as a food ». *1er ed. Univ. of Wisconsin Press, Madison.* p. 363-385.

HAMM R., DEATHERAGE F. E., 1960. Changes in hydration, solubility and charges of muscle proteins during heating of meat. *Food Res.*, **25**, 587-610.

HARRIES J. M., RHODES D. N., CHRYSTALL B. B., 1972. Meat texture. 1. Subjective Assessment of the texture of cooked beef. *J. Texture Studies*, **3**, 101-114.

HELLENDOORN E. W., 1962. Water Binding capacity of meat as affected by phosphates. 1. Influence of sodium chloride and phosphates on the water retention of comminuted meat at various pH values. *Food Technology*, **16**, 119-124.

HOFMANN K. 1971. Zur Definition des Wasserbindung des Fleisches. *Fleischwirtschaft*, **51**, 806-807.

HOFMANN K., 1975. Ein neues Gerät zur Bestimmung der Wasserbindung des Fleisches: das « Kapillar Volumeter ». *Fleischwirtschaft*, **55**, 25-30.

HORSFIED S., TAYLOR L. J., 1976. Exploring the relationship between sensory data and acceptability of meat. *J. Sci. Fd. Agric.*, **27**, 1044-1056.

IGLESIAS H. A., CHIRIFE J., 1976. Equilibrium moisture contents of air dried beef, dependance on drying temperature. *J. Fd Technol.*, **11**, 565-573.

JACQUET B., POTERRE P., PINSON M. 1975. Influence de différents sucres dans les pièces salées cuites obtenues par saumurage. *Revue de la Conserve. Alimentation Moderne*, n° 38, p. 33-38.

JAKOBSON B., BENGTSSON N., 1973. Freezing of raw Beef: influence of aging, freezing rate and cooking method on quality and yield. *J. Food Sci.*, **38**, 560-565.

JANICKI L. J., APPLEDORF H., 1974. Effect of broiling, grill frying and microwave cooking on moisture, some lipid components and total fatty acids of ground beef. *J. Food Sci.*, **39**, 715-717.

JAY J. M., 1966. Relationship between the phenomena of extract-release volume and water holding capacity of meats as simple and rapid methods for determining microbial quality of beef. *Health Laboratory Science*, **3**, 101-110.

JEREMIAH L. E., SMITH G. C., CARPENTER Z. L., 1971. Palability of individual muscles from ovine leg steaks as related to chronological age and marbling. *J. Food Sci.*, **36**, 45-47.

KARMAS E., 1973. Water in Biosystems (Symposium: Protein Interaction in Biosystems). *J. Food Sci.*, **38**, 736-739.

KARMAS E., DIMARCO G. R. 1970 *b*. Dehydratation thermoprofiles of amino acids and proteins *J. Food Sci.*, **35**, 615-617.

KARMAS E., DIMARCO G. R. 1970*b*. Denaturation thermoprofiles of some proteins. *J. Food Sci.*, **35**, 725-727.

KELLER J. D., KINSELLA J. E., 1973. Phospholipid changes and lipid oxidation during cooking and frozen storage of raw ground beef. *J. Food Sci.*, **38**, 1200-1204.

KEMP J. D., MONTGOMERY R. E., FOX J. D., 1976. Chemical, palability and cooking characteristics of normal and low quality pork loins as affected by freezer storage. *J. Food Sci.*, **41**, 1-3.

KHAN A. W., NAKAMURA R., 1971. Quality and biochemical changes during frozen storage of meat from epinephrine-treated and untreated chickens. *J. Food Sci*, **37**, 145-147.

KOTTER L., PRANDL O., TERPLAN G., 1968. Zur Prüfung des Safthaltvermögens von Fleisch beim Erhitzen. *Fleischwirtschaft*, **48**, 439-442.

LAAKKONEN E., 1973. Factors affecting tenderness during heating of meat. Advances in *Food Research*, **20**, p. 257-323.

LAROCHE M., 1977. Influence de la cuisson sur la qualité de la viande. *Bull. Techn.*, C.R.Z.V. Theix I.N.R.A., **29**, 5-12.

LAROCHE M., SALÉ P., 1977. Résultats non publiés.

LAROCHE M., VALIN C., 1977. Résultats non publiés.

LAWRIE R. A., 1974. Meat Science. 2e *ED. Pergamon Press Ltd*; Oxford.

LEUNG H. K., STEINBERG M. P., WEI L. S., NELSON A. I., 1976. Water binding of macromolecules determined by pulsed NMR. *J. Food Sci.*, **41**, 297-300.

LINDENBERG A. B., GARY-BOBO C., 1960. Eau non solvante et eau d'hydratation protéique du muscle de grenouille. *Arch. Sci. Physiol.*, **XIV**, 303-320.

LOCKER R. H., CARSE W. A., 1976. Extensibility, Strength and Tenderness of beef cooked to various degrees. *J. Sci. Fd. Agric.*, **27**, 891-901.

LOCKER R. H., DAINES G. J., 1973. The effect of repeated freeze. Thaw cycles on tenderness and cooking loss in beef. *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 1273-1275.

LOCKER R. H., DAINES J. D., 1974*a*. Effect of mode of cutting on cooking loss in beef. *J. Sci. Fd. Agric.*, **25**, 939-946.

LOCKER R. H., DAINES G. J., 1974*b*. Cooking loss in beef. The effect of cold shortening, searing and rates of heating; time course and histology of changes during cooking. *J. Sci. Fd Agric.*, **25**, 1411-1418.

LOCKER R. H., DAINES G. J., 1975. Effect of shortening during cooking on the tenderness and histology of beef. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 1711-1720.

LOCKER R. H., DAINES G. J., 1976. Tenderness in relation to the temperature of Rigor onset in cold shortened Beef. *J. Sci. Fd. Agric.*, **27**, 193-196.

LUMRY R., 1973. Some recent ideas about the nature of the interaction between proteins and liquid water (Symposium : Protein interactions in Biosystems). *J. Food Sci.*, **38**, 744-755.

MAC FARLANE J. J., HARRIS P. V., SHORTHOSE W. R., 1974. Manipulation of meat quality, particularly tenderness, by the processor. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, **10**, 219-226.

MAC NEIL J. H., DIMICK P. S., 1970. Poultry product quality. 1. Compositional changes during cooking of turkey roasts. 2. Storage time-temperature effects on carbonyl composition of cooked turkey and chicken skin fractions. 3. Organoleptic evaluation of cooked chicken and turkey skin fractions as affected by storage time and temperature. *J. Food Sci.*, **35**, 184-194.

MILLER W. O., SAFFLE R. L., ZIRKLES B., 1968. Factors which influence the water holding capacity of various types of meat. *Food Technology*, **33**, 1139-1142.

MOLONON B. R., BOWERS J. A., 1976. Sensory evaluation and protein value of beef and beef-cottonseed blends. *J. Food Sci.*, **41**, 1263-1265.

MONIN G., 1976. Déterminisme biochimique et évolution *post mortem* des critères de la qualité des viandes de porc. I.T.P. Journée d'étude du 8 avril 1976: La qualité des viandes de Porc, pp. 5-29.

NORRIS H. L., HARRISON D. L., ANDERSON L. L., VON WELCK B., TUMA H. J., 1971. Effects of physiological maturity of beef and marbling of rib steaks on eating quality. *J. Food Sci.*, **36**, 440-444.

PETTINATI J. D., SWIFT C. E., COHEN E. H., 1973. Moisture and fat analysis of meat and meat products: a review and comparison of methods. *JAOAC*, **56**, 544-561.

POCSIK S., 1967. Bound water in Muscle. *Acta Biochim. et Bioph. Acad. Sci. Hung.* **2**, 149-160.

POCSIK S. 1969. Structure of water in Muscle. *Acta Biochim. et Bioph. Acad. Sci. Hung.*, **4**, 395-402.

RITCHEY S. J., 1965. The relationships of total, bound and free water and Fat content to subjective scores for eating quality in two beef muscles. *J. Food Sci.*, **30**, 375-381.

RITCHEY S. J., HOSTETLER R. L., 1964. Relationship of free and bound water to subjective score for juiciness and softness and to changes in weight and dimensions of steaks from two beef muscles during cooking. *J. Food Sci.*, **29**, 413-419.

ROBERTS J. E., FIELD R. A., BOOREN A., MEYERS T. G., 1976. Pressed tenderloin steak quality as influenced by anatomical location, storage time and internal temperature prior to cooking. *J. Food Sci.*, **41**, 1107-1109.

ROBERTS P. C.B., LAWRIE R. A., 1974. Effects bovine L. dorsi muscle of conventional and microwave heating. *J. Fd Technol.*, **9**, 345-356.

RODEL W., LEISTNER L., 1971. Ein einfacher aw-wert-Messer fur die Praxis. *Fleischwirtschaft*, **51**, 1800-1802.

RODEL W., LEISTNER L., 1972. Messung der Wasseraktivitat (aw-Wert) von Fleisch und Fleischwaren mit einem Taupunkt-Hygrometer. *Fleischwirtschaft*, **52**, 1461-1462.

SANDERSON M., VAIL G. E., 1963. Fluid content and tenderness of three muscles of beef cooked to three internal temperatures. *J. Food Sci.*, **28**, 590-595.

SCHMIDT J. G., KLINE E. A., PARRISH F. C., Jr. 1970. Effect of carcass maturity and internal temperature on bovine Longissimus attributes. *J. Animal Sci.*, **31**, 861-865.

SHAFFER T. A., HARRISON D. L., ANDERSON L. L., 1973. Effects of end point and oven temperatures on beef roasts cooked in oven film bags and open pans. *J. Food Sci.*, **38**, 1205-1210.

SHOCK D. R., HARRISON D. L., ANDERSON L. L., 1970. Effect of dry and moist beat treatments on selected beef quality factors. *J. Food Sci.*, **35**, 195-198.

SHULTS G. W., RUSSEL D. R., WIERBICKI E., 1972. Effect of condensed phosphates on pH, swelling and water holding capacity of beef. *J. Food Sci.*, **37**, 860-864.

SMITH G. C., DUTSON T. R., HOSTETLER R. L., CARPENTER Z. L., 1976. Fatness, rate of chilling and tenderness of lamb. *J. Food Sci.*, **41**, 748-756.

TOURAILLE C., 1977. Communication personnelle.

WOOLSEY A. P., PAUL P. C., 1969. External fact cover influence on raw and cooked beef. 1. Fat and moisture content. 2. Cooking time, losses, Press fluid and shear force values. *J. Food Sci.*, **34**, 554-556 et 568-569.

WATSON E. L., NI Y. W., RICHARDS J. F., 1974. Effect of irradiation and freezing rate on rehydration of freeze dried beef. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, **7**, 232-235.

WENTHAM L. M., LOCKER R. H., 1976. The effect of marinading on beef. *J. Sci. Fd Agric.*, **27**, 1079-1084.

WIERBICKI E., DEATHERAGE F. E., 1958. Determination of water holding capacity of fresh meats. *J. Agr. Food Chem.*, 6. 387. Cité par HAMM (1960).

WIERBICKI E., TIEDE M. G., BURRELL R. C., 1963. Determination of meat swelling as a method for investigating the waterbinding capacity of muscle proteins with low water holding forces. *Fleischwirtschaft*, **15**, 396-408.

WISMER-PEDERSEN J., 1965. Effect of EDTA and pH on properties of freeze dried Pork muscle. II. Effect of injection of EDTA and NaOH before drying. *J. Food Sci.* **30**, 91-97.

Ann. Technol. agric., 1978, **27** (4), 873-915.

Les vitamines des céréales et des produits céréaliers.

J. ADRIAN

avec la collaboration technique de Danièle GERBAUD-BALLUE

Chaire de Biochimie du C.N.A.M., 292, rue St-Martin, 75003 Paris

---

Mots clés : *vitamines, céréales et produits dérivés, nature, localisation, conservation, transformations technologiques.*

Introduction

Les céréales sont d'abord consommées pour leur apport énergétique, ensuite pour leur contenu protidique. Même dans les régions les plus développées — où l'alimentation est abondante et diversifiée — les produits céréaliers occupent une position importante comme source d'énergie et de protéines.

Il n'en est pas de même en ce qui concerne les vitamines. Certaines font totalement défaut dans les céréales : vitamine D, vitamine K, vitamine C, vitamine B12 et vitamine A (à l'exception du maïs jaune). De plus, dans les dérivés céréaliers consommés, les autres vitamines ne sont présentes qu'à des taux souvent faibles, les processus technologiques de transformation réduisant et endommageant le potentiel vitaminique du grain entier.

Ces défauts vitaminiques des céréales retentissent de façon spectaculaire en alimentation humaine en raison de la part des produits céréaliers dans la ration : moins celle-ci sera variée, plus les déficiences de la céréale de base seront préjudiciables pour le consommateur.

Il n'est que de rappeler les ravages provoqués par le béribéri chez les utilisateurs de riz blanchi, ceux causés par la pellagre dans toutes les régions où le maïs constitue l'élément de base, y compris dans un certain nombre de pays du Sud-Est européen, ou encore l'apparition du scorbut et de l'axérophtalmie durant les saisons sèches pendant lesquelles les céréales ne sont plus corrigées par des apports de produits frais, fruits et légumes.

Sur le plan vitaminique, l'attention doit être particulièrement attirée sur ce que les céréales ne fournissent pas. Il convient de préciser l'origine de ces défauts : absence dans le grain, inefficacité des formes contenues, élimination des facteurs au cours des opérations de transformations primaires et secondaires, etc.

Dans ce domaine, les processus technologiques influencent considérablement le niveau vitaminique du consommateur. Nous n'en citerons qu'un exemple presque historique maintenant : en Grande-Bretagne, pendant la Seconde guerre mondiale, à un moment donné on a constaté une élévation en vitamine B1 du lait maternel, bénéfique au nourrisson. Ce phénomène fut la conséquence lointaine de la décision d'élever le taux d'extraction de la farine destinée à une population dont les ressources alimentaires étaient alors contingentées.

Le propos de cet exposé est de mettre en relief le potentiel vitaminique du grain entier des céréales et l'évolution des facteurs vitaminiques au cours des diverses technologies meunières et boulangères. Nous rappellerons brièvement les faits classiques, déjà exposés dans des mises au point antérieures (CAUSERET et MOCQUOT, 1964; ADRIAN et PETIT, 1970, etc.) et nous développerons certains aspects plus récents comme la nature des vitamines liposolubles présentes dans les céréales, les données relatives à l'efficacité de la niacine et de la biotine, l'influence des procédés modernes de panification et de cuisson sur le potentiel et l'efficacité vitaminiques, etc.

Les vitamines du grain entier

Plusieurs principes généraux régissent la composition vitaminique d'une production alimentaire.

Les teneurs en vitamines offrent une variabilité importante, leur mobilité étant habituellement très supérieure à celle des composants majeurs, glucides, lipides et protéines. Elle est comparable à celle des oligo-éléments minéraux. Cette variabilité est due à l'influence de nombreux facteurs : données génétiques, modalités culturales et climatiques, environnement au sens large du terme.

Les vitamines se présentent, de surcroît, sous des formes diverses : vitamine elle-même ou pro-vitamines, isomères variés, etc. Chacune de ces formes a une valeur physiologique ou un intérêt technologique particuliers.

Formes et efficacités vitaminiques

Vitamine A

Si la vitamine elle-même est absente des graines de céréale, on rencontre des pro-vitamines (les carotènes) dans certaines d'entre elles, souvent noyées parmi d'autres pigments (les xanthophylles) dépourvus d'efficacité vitaminique, mais utiles sur le plan technologique en raison de leur coloration jaune.

Dans les blés, les analyses récentes ne concordent pas toutes, bien que chacun s'accorde à reconnaître la place importante de la lutéine, un xanthophylle, parmi les pigments caroténoïdes de cette céréale (FARRE-ROVIRA et COSTES, 1974).

La lutéine se présente à l'état libre ou estérifié. Dans un blé tendre, les esters atteignent jusqu'à 80 p. 100 de la lutéine totale, les monoesters étant prédominants. A l'inverse dans un blé dur, 85 p. 100 de la lutéine sont à l'état libre (LEPAGE et SIMS, 1968).

Le point le plus controversé est la concentration en β carotène dans les blés. Selon LEPAGE et SIMS, cette pro-vitamine serait absente; selon WILDFEUER et ACKER (1968), elle constituerait 1/100 des caroténoïdes totaux dans les semoules de blé; d'après FARRE-ROVIRA et COSTES le rapport « lutéine/β Carotène » serait de l'ordre de 1 dans les produits céréaliers :

	Teneurs (mg p. 100 g)	
	β carotène	lutéine
Farine de blé tendre	0,27	0,31
Semoule de blé dur	0,52	0,60

Chez les maïs, la situation est particulière, les races à grain jaune étant les seules céréales riches en pigments caroténoïdes. La très grande majorité d'entre eux sont des xanthophylles, inactifs sur le plan physiologique. Les carotènes actifs sont dans un rapport de 1 à 10 avec les xanthophylles :

	Teneurs (mg p. 100)			Rapport « xanthophylles / carotènes »
	Caroténoïdes totaux	Xanthophylles	Carotènes	
BLESSIN *et al.* (1963)	2,1	1,9	0,17	11
QUACKENBUSCH *et al.* (1963) . .	2,2	1,95	0,24	8
GROGAN et BLESSIN (1973) . . .	3,9	3,5	0,35	10

TABLEAU I

Teneurs en vitamines liposolubles du maïs jaune et du maïs blanc(*)

	Maïs jaune		Maïs blanc
	en mg p. 100 g	en p. 100	en mg p. 100 g
Tocophérols totaux	5,75		5,35
Caroténoïdes totaux	2,91	*100*	0,05
Béta-carotène.	0,182	*6,5*	
Béta-zéacarotène	0,116	*4,0*	
Zéta-carotène	0,100	*3,5*	
Lutéine	1,280	*44,0*	
Zéaxanthine	0,690	*25,0*	
Crytoxanthine	0,172	*6,0*	
Zéinoxanthine	0,149	*5,0*	
Xanthophylles estérifiés	0,097	*3,5*	
Autres pigments	0,124	*4,5*	
Teneur en huile (g p. 100 g).	3,88		3,44

(*) D'après QUACKENBUSCH *et al.* (1963).

Le tableau 1 met en évidence l'accumulation spécifique des caroténoïdes dans les maïs à grain jaune, les variétés à grain blanc en sont dépourvues à l'égal de la plupart des céréales (QUACKENBUSCH *et al.*, 1963). Dans les 109 échantillons analysés par ces auteurs, les xanthophylles sont essentiellement représentés par la lutéine et la zéaxanthine et les carotènes par 3 molécules différentes.

Dans le seigle, la répartition est différente puisque les xanthophylles renferment de la taraxanthine et du lycopène, ce dernier étant le principal pigment de la tomate (KLYUSHKINA *et al.*, 1970).

Vitamine E

Elle se présente à l'état de différents isomères, les plus connus étant les alpha, béta, gamma et delta tocophérols. Leur valeur vitaminique — inverse de leur pouvoir anti-oxygène — va dans l'ordre décroissant ci-dessus (WARD, 1958; *in* ADRIAN et JACQUOT, 1968).

La répartition des tocophérols dans les céréales est assez complexe ainsi qu'il résulte des analyses de KOVATS *et al.* (1970) et de GRAMS *et al.* (1970) :

	Répartition des tocophérols dans le blé et le maïs, en p. 100			
	Tocophérol		tocotriénol	
	blé	maïs	blé	maïs
Isomère alpha	37	31	6	1
béta	32	0	0	0
gamma	10	65	1	2
delta	8	1	0	0

Les tocophérols du blé, en majorité sous forme α et β ont une activité vitaminique plus forte et un pouvoir anti-oxygène plus faible que les tocophérols du maïs où prédomine le gamma tocophérol.

Dans le seigle également, la vitamine E se présente sous forme de différents isomères du tocophérol (KLYUSHKINA *et al.*, 1970), ce qui paraît être une règle chez les céréales.

Vitamine B6

Selon POLANSKY *et al.* (1964), dans la plupart des céréales la pyridoxine est la forme dominante de la vitamine B6, exception faite du maïs qui renferme 50 p. 100 de sa vitamine sous forme de pyridoxal. Cette dernière serait à l'état libre dans les céréales :

	Vitamine B6 totale (mg p. 100)	Forme vitaminique (en p. 100)		
		Pyridoxine	Pyridoxal	Pyridoxamine
Maïs	0,62	14	53	32
Blé	0,39	73	13	15
Riz paddy	0,54	79	11	10
Riz blanchi	0,24	62	20	19

La présence de pyridoxal assure au maïs une efficacité vitaminique maximale. Cependant, en raison de la sensibilité thermique de cette molécule, les cuissons endommageront davantage le potentiel vitaminique B6 du maïs que celui des autres céréales.

Vitamine PP

L'efficacité de la vitamine PP des céréales — principalement du maïs — fait l'objet de recherches et de discussions animées, remontant à plusieurs décennies (JUSTIN-BESANÇON et LWOFF, 1942; KREHL *et al.*, 1944; KREHL, 1949; JACQUOT *et al.*, 1950; KODICEK *et al.*, 1956).

Les formes sous lesquelles sont présents la niacine, les déséquilibres en acides aminés — par défaut et par excès — la présence de facteurs antagonistes de la niacine ont été invoqués à tour de rôle pour expliquer le caractère pellagrogène du maïs et secondairement du sorgho.

Il faut rappeler que l'activité vitaminique PP provient d'abord de l'acide nicotinique ou niacine et ensuite de la conversion possible du tryptophane en acide nicotinique. Actuellement, on admet que pour l'Homme le taux de conversion est tel que 60 mg d'acide aminé donnent naissance à 1 mg de niacine. Les besoins ou les efficacités sont donc exprimés sous forme d'équivalent-niacine. Cette unité correspond à 1 mg d'acide nicotinique ou à 60 mg de tryptophane.

Dans le cas des céréales, l'efficacité de la vitamine PP demeure encore discutée. Contrairement à ce qui a lieu avec les productions animales, dans les organes végétaux une fraction de la niacine est difficilement extractible *in vitro* et semble inefficace biologiquement pour l'animal.

Dès 1942, JUSTIN-BESANÇON et LWOFF signalaient cette particularité, estimant que 30 p. 100 seulement de la niacine des céréales était utilisable. Par la suite, de nombreux auteurs confirmèrent ces observations (KREHL *et al.*, 1944; WOOLEY, 1946; BORROW *et al.*, 1948; HARPER *et al.*, 1958; KODICEK et WILSON, 1960; etc.).

D'une manière générale, une fraction de la niacine est libérée *in vitro* à l'aide de HCl N/10 à l'autoclave; cette portion est estimée correspondre à la quantité biologiquement utilisable. Le reste de la niacine a été pendant longtemps hydrolysé par un traitement alcalin. Diverses molécules de structure complexe ont été isolées du maïs : la niacytine (KODICEK et WILSON, 1960), le niacinogène (DAS et GUHA, 1960) ou encore une molécule mal définie (CHRISTIANSON *et al.*, 1968). Ces composés ne deviennent effectivement actifs qu'après un traitement alcalin, l'acide à faible concentration étant incapable de les convertir en niacine efficace.

En réalité, la distinction entre niacine hydrolysée en milieu acide ou en milieu alcalin constitue un critère erroné : il n'existe pas de formes vitaminiques exigeant

de façon spécifique l'action d'un réactif alcalin pour leur conversion en niacine active. Les fractions combinées sont hydrolysées très aisément par voie alcaline mais peuvent l'être également sous l'effet d'un acide à la condition que la concentration soit suffisante (HCl 2N) et que le traitement ait lieu à l'autoclave.

Dans de telles conditions, il est possible de libérer encore une faible fraction de niacine résistant à l'action des agents alcalins (ADRIAN, 1969*a*).

Au total, les céréales renferment 4 fractions de niacine : l'une est libérée à la suite d'un autoclavage en milieu aqueux, une seconde n'apparaît qu'après un traitement en milieu HCl N/10, une troisième résulte de l'action de la soude 1N et une quatrième exige un traitement acide fort (HCl 2N). Le tableau 2 rapporte la répartition de ces différentes fractions dans les principales céréales (ADRIAN, 1970*a*). Les deux premières sont estimées utilisables, les deux dernières sont des formes combinées réputées inefficaces biologiquement.

Bien que la niacine soit à un taux assez bas dans le maïs, la pellagre observée dans les régions maïdiques ne peut être attribuée à cette simple particularité. En effet, l'avoine, le mil pennisetum, le riz offrent des teneurs du même ordre sans pour autant être impliqués dans l'étiologie de la pellagre. De plus, contrairement à ce qui a été admis, ou supposé, pendant longtemps, ce n'est pas la présentation de la niacine dans le maïs qui peut en faire une production pellagrogène (LUCE *et al.*, 1966) : les analyses du tableau 2 montrent, au contraire, que le maïs est la céréale renfermant le pourcentage le plus élevé (77 p. 100) de niacine sous forme disponible.

TABLEAU 2

Taux et répartition de la niacine des céréales(*)

	Teneur totale (mg p. 100	Pourcentage de niacine libéré par				Niacine utilisable ($a + b$) (p. 100)
		H_2O (a)	HCl N/10 (b)	NaOH 1N (c)	HCl 2N (d)	
Avoine	1,32	39	30	23	8	69
Maïs	2,42	45	32	19	4	77
Mil pennisetum	2,46	36	36	20	8	72
Riz paddy	2,98	35	20	40	5	55
Sorgho	4,06	26	33	21	20	59
Blé	5,63	27	40	19	14	67
Orge	9,40	27	29	31	13	56

(*) D'après ADRIAN, MURIAS DE QUEIROZ et FRANGNE (1970*a*).

L'origine du caractère pellagrogène du maïs doit donc être recherchée ailleurs. Dans une alimentation maïdique, la pellagre résulte de la conjonction de 3 facteurs : un faible apport en niacine, une pauvreté caractéristique des protéines du maïs en tryptophane, précurseur de l'acide nicotinique, et une médiocre qualité nutritionnelle des protéines qui inhibe l'utilisation biologique de la niacine consommée (BOISSELOT-LEFEBVRES *et al.*, 1977*a*; 1977*b*).

Le maïs se distingue essentiellement des autres céréales par son faible apport de niacine sous forme de tryptophane; il se situe même à l'inverse de l'alpiste des oiseaux (*Phalaris canariensis* L), petite céréale des contrées méditerranéennes, dont la richesse exceptionnelle en tryptophane en fait un agent efficace dans la prévention de la pellagre (ADRIAN *et al.*, 1969*c*, 1970*b*). Le tableau 3 fait ressortir la pauvreté du maïs en tant que source d'Équivalents-niacine, conséquence de sa déficience en tryptophane. (ADRIAN *et al.*, 1969*a*, 1969*b*, 1969*c*).

TABLEAU 3

Apport en Équivalent-niacine des céréales(*)

	Apport en mg p. 100 g			
	Tryptophane		*Ac. nicotinique utilisable*(***) (*b*)	*Équivalent-niacine utilisables* (*a* + *b*)
	Apport	Équivalent-niacine(**) (*a*)		
Maïs	69	1,15	1,85	3,00
Sorgho	111	1,85	2,4	4,25
Mil pennisetum	192	3,2	1,75	4,95
Blé	110	1,85	3,75	5,60
Riz	107	1,80	4,15	5,95
Alpiste des oiseaux	514	8,60	0,7	9,30

(*) D'après ADRIAN *et al.* (1969*a*, 1969*b*, 1969*c*).
(**) Correspond à la 60e partie de la teneur en tryptophane.
(***) Fraction extractible par HCl N/10.

Hormis la pauvreté du maïs en Équivalents-niacine, d'autres facteurs ont été invoqués pour expliquer son rôle dans l'étiologie de la pellagre, notamment l'excès de leucine contenu dans ses protéines (GOPALAN et SRIKANTIA, 1960; GOPALAN, 1969; etc.) et la présence d'anti-vitamines de compétition comme le 3-acétylpyridone (WOOLEY, 1945, 1946). Cette dernière éventualité paraît abandonnée de nos jours.

En ce qui concerne l'action de la leucine, il vient d'être montré qu'à taux même élevé cet acide aminé ajouté à une ration équilibrée ou déficiente sur le plan protidique ou vitaminique n'entraîne pas un épuisement significatif de la niacine corporelle de l'animal (BOISSELOT-LEFEBVRES *et al.*, 1978).

Par contre, il est vrai que les profondes déficiences en lysine et en tryptophane des protéines du maïs constituent un frein important en ce qui regarde l'utilisation métabolique des vitamines de la ration : à ingéré de niacine égal, les réserves sanguines et hépatiques de vitamine PP sont directement proportionnelles à la qualité azotée de la ration, ainsi que le tableau 4 en apporte une démonstration (ADRIAN, 1973, BOISSELOT-LEFEBVRES *et al.*, 1977*a*, 1977*b*).

La complexité de la situation observée dans le maïs tient au fait que la déficience de cette céréale en tryptophane est responsable à la fois d'une médiocre

TABLEAU 4

Efficacité de la niacine d'une ration maïdique en fonction de sa qualité protidique(*)

Nature de la ration	Coefficient d'Efficacité protidique (*a*)	Niacine du foie µg par g)
Maïs seul (*b*)	0,88	102
idem + niacine	0,99	109
Maïs + lysine	1,63	134
idem + niacine	1,51	140
Maïs + lysine + tryptophane	2,38	209
Ration témoin (caséine)	1,86	185

(*a*) Gain de poids/protéines ingérées.
(*b*) Supplémenté en isoleucine, thréonine, méthionine et valine.

(*) D'après BOISSELOT-LEFEBVRES *et al.* (1977*a*).

qualité protidique et d'un faible apport en Équivalent-niacine. Il est certain qu'aujourd'hui encore le taux de conversion tryptophane → niacine demeure imprécis, de même que l'ordre de priorité des fonctions du tryptophane.

Autres vitamines B

L'efficacité des autres vitamines B n'a pas fait l'objet de recherches très précises. On pourrait en conclure qu'elle ne pose pas de problèmes aussi complexes que celle de la vitamine PP. Apparemment ces facteurs sont sous des états biologiquement disponibles, à l'exception, peut-être, de la biotine. En effet, selon WAGSTAFF *et al.* (1961) et FRIGG (1976), la biotine des céréales serait douée d'une efficacité irrégulière, si on retient comme critère de sa disponibilité la vitesse de croissance du poulet.

Son efficacité est de 100 p. 100 dans le cas du maïs, mais elle se situe vers 20 à 30 p. 100 dans le cas de l'avoine et du sorgho et elle est minime dans le cas du blé et de l'orge.

Par ailleurs, il faut mentionner la présence d'un facteur anti-thiamine isolé du son de riz par CHAUDHURI (1962, 1964); d'après cet auteur, 1 mg de cette substance inhiberait 0,2 µg de vitamine B1. Dans la mesure où elle serait activée au cours de la conservation du riz, cette molécule pourrait avoir des incidences pratiques et expliquer notamment la fragilité particulière de la thiamine du riz pendant le stockage.

La thiamine ne serait pas à l'état phosphorylé dans les céréales (PETIT, 1950; SEN et ROBINSON, 1963).

Variabilité des teneurs vitaminiques

Les teneurs en vitamines présentent toujours une grande variabilité. De nombreuses analyses ont mis en évidence un rapport de 1 à 2 entre les taux de vitamines dans une même céréale. Les résultats de SCHULTZ *et al* (1941) montrent, par exemple, que les écarts sont plus importants entre divers échantillons d'une céréale qu'entre les valeurs moyennes de graminées différentes :

	Nombre d'échantillons	Teneur en mg p. 100	
		Moyenne	Valeurs extrêmes
Blé	31	0,56	0,42-0,73
Avoine	21	0,72	0,48-1,03
Orge	37	0,62	0,38-0,92
Sarrazin	5	0,60	0,42-0,85
Seigle.	10	0,48	0,40-0,58

Ces variabilités, parfois considérables, tiennent essentiellement à deux causes :

— le patrimoine génétique de la plante conditionne son développement anatomique (importance relative des diverses fractions du grain), sa composition chimique (conséquence du métabolisme de la graine et du déterminisme des réserves accumulées);

— les conditions climatiques et culturales déterminent également le plein développement de la plante et de ses organes de réserve. Il est bien connu que les « coups de chaleur » ont des conséquences notables sur la composition des grains.

Il s'avère, en fait, très malaisé d'isoler un de ces facteurs et de mettre en évidence la part de responsabilité qu'il a dans le potentiel vitaminique des céréales.

Influence des facteurs génétiques

Les analyses de QUACKENBUSCH *et al.* (1963), déjà citées et portant sur 109 lignées pures de maïs jaune, font ressortir l'influence considérable que peut avoir le patrimoine génétique (tabl. 5), faisant apparaître par là même le caractère abstrait et illusoire des « valeurs moyennes » lorsqu'il s'agit de vitamines.

Même lorsque ces lignées pures de céréales sont cultivées dans des conditions contrôlées et optimales, en station agronomique, la variabilité des teneurs vitaminiques demeure à un très haut niveau; cette remarque s'applique à l'ensemble des facteurs, qu'ils soient liposolubles ou hydrosolubles, ainsi qu'il ressort des résultats fournis dans le tableau 6 se rapportant à des maïs définis génétiquement et produits en station expérimentale (KARLIN *et al.*, 1966; CARBALLIDO *et al.*, 1971).

Le maïs constitue probablement le plus bel exemple de l'influence des données génétiques sur le potentiel vitaminique du grain : les tocophérols comme les vitamines hydrosolubles sont à des niveaux comparables dans les variétés à grain jaune et à grain blanc, mais les premières accumulent de façon spécifique les pigments caroténoïdes, aussi bien les pro-vitamines A que les xanthophylles inactifs (tabl. 1) (QUACKENBUSCH *et al.*, 1963; OSIFO, 1971; NAUMOVIC et NAUMOVIC, 1973; etc.).

TABLEAU 5

Variabilité des caroténoïdes dans les maïs jaunes(*)

Teneurs (mg p. 100)	Teneur moyenne	Teneurs extrêmes
béta-carotène	0,182	0,010-0,500
béta-zéacarotène	0,116	0,0 -0,470
zéta-carotène	0,100	0,0 -0,420
lutéine	1,280	0,200-3,310
zéaxanthine	0,690	0,060-2,740
cryptoxanthine	0,172	0,030-0,520
Zéinoxanthine	0,149	0,0 -0,780

(*) D'après QUACKENBUSCH *et al.* (1963).

TABLEAU 6

Influence des facteurs génétiques sur les teneurs vitaminiques : variabilité de lignées différentes cultivées dans des stations expérimentales(*)

	Teneur moyenne	Teneurs extrêmes
Teneurs (mg p. 100)		
caroténoïdes totaux	1,61	0,82-2,80
thiamine	0,41	0,37-0,74
riboflavine	0,10	0,09-0,19
niacine	2,78	1,78-5,62
pyridoxine	0,76	0,51-0,92
ac. folique	0,025	0,015-0,036
biotine	0,009	0,006-0,036

(*) D'après KARLIN *et al.* (1966), CARBALLIDO *et al.* (1971).

Influence des facteurs agronomiques

Pour établir une liaison avec le paragraphe précédent, on peut citer une série d'analyses portant sur des sorghos et des mils sénégalais, en provenance de cultures traditionnelles locales ou issues de cultures en station expérimentale. Les secondes sont cultivées sous le même climat que les premières mais dans des conditions plus favorables en ce qui concerne les fumures ou l'irrigation, etc.

Les souches de station manifestent entre elles des écarts aussi importants que les échantillons des productions locales, mais elles s'en distinguent par un potentiel moyen qui tend à être nettement accru (tabl. 7) (ADRIAN et SAYERSE, 1954; 1957).

Une même observation a été faite à propos des blés turcs, concernant la thiamine (SARACOGLU, 1953) :

	Nombre d'échantillons	Teneurs en mg p. 100	
		Moyenne	Valeurs extrêmes
Cultures locales	28	0,39	0,11-0,50
Cultures de station . . .	10	0,45	0,39-0,51

Selon ces faits, il pourrait être conclu au rôle bénéfique des engrais sur les concentrations vitaminiques des céréales. L'hypothèse ne peut être écartée d'emblée en ce qui concerne les pays où l'agriculture n'est pas encore pleinement développée. Par contre, dans les régions fortement industrialisées, les essais ont abouti à des résultats négatifs.

TABLEAU 7

Influence des facteurs agronomiques sur les teneurs vitaminiques : comparaison entre des échantillons tout-venant et des productions de station agronomique(*)

	Nombre d'échantillons	Teneurs (mg p. 100)			
		Thiamine	Riboflavine	Niacine	Pantothénate Ca
Sorghos sénégalais :					
cultures tout-venant . .	4	0,26	0,12	3,80	1,05
cultures de station . . .	13	0,61	0,14	5,80	1,20
Mils pennisetum sénégalais :					
cultures tout-venant . .	7	0,32	0,15	1,80	1,10
cultures de station . . .	8	0,36	0,20	3,35	1,25
Supériorité moyenne des cultures de station (p. 100) .		74	25	70	14

(*) D'après ADRIAN et SAYERSE (1954, 1957).

Ainsi, en France, les productions récoltées sur des parcelles recevant du fumier ou un engrais NPK n'ont pas un potentiel vitaminique supérieur aux grains récoltés sur des terres privées d'engrais depuis de longues années (KARLIN *et al.*, 1966). De même, aux U.S.A. l'emploi d'engrais vert, de nitrates, de superphosphates ou d'azote — donnés seuls ou en association — ne modifie pas systématiquement les teneurs en vitamines B1 et PP (BAINS, 1953).

La seule corrélation positive entre l'adjonction d'engrais et les concentrations en vitamines concerne les améliorations enregistrées à la suite d'une fumure azotée tardive (KARLIN *et al.*, 1966; JAHN-DEESBACH et MAY, 1972).

En dehors des modalités culturales, l'environnement — au sens le plus large — détermine dans une certaine mesure la richesse vitaminique des céréales. Selon certains, cette influence serait même plus importante que celle des données génétiques.

Elle a été mesurée notamment par HAMNER (*in* SOMERS et BEESON, 1948) en collationnant les teneurs en vitamines B1 de 30 souches de blé référenciées et cultivées dans diverses contrées des U.S.A., c'est-à-dire avec des modalités culturales analogues. L'influence de la localisation des cultures s'est traduite de la façon suivante : dans le Texas la teneur moyenne de thiamine a été de 0,72 mg p. 100, dans le Colorado elle a été de 0,57 mg, dans le Nébraska elle est tombée à 0,52 mg et enfin elle a été de 0,49 mg dans l'Iowa. Les productions du Texas contenaient presque 50 p. 100 de thiamine de plus que celles de l'Iowa!

Influence de la saison

Il apparaît des différences entre les blés d'hiver et ceux de printemps. Les productions d'hiver tendent à être moins bien pourvues en thiamine (0,33 à 0,46 mg p. 100) que celles de printemps (0,45 à 0,60 mg) (JAHN-DEESBACH et MAY, 1972). Un écart encore plus marqué différencie les teneurs en vitamine E, les blés d'hiver contenant 0,85 mg de α tocophérol contre 1,40 mg dans les blés de printemps (LORENZ et LIMJARCENRAT, 1974).

Il est d'autant plus difficile de préciser l'origine de ces différences que certains auteurs ne les ont pas perçues (TEPLY *et al.*, 1942; KARLIN *et al.*, 1966).

Variabilité dans l'épi

Peu de travaux ont été consacrés à l'hétérogénéité des grains contenus dans un même épi; cependant ce phénomène risque de présenter des incidences pratiques et de compliquer le problème des échantillonnages.

Parce que les grains de la partie supérieure de l'épi de maïs sont plus exposés à la lumière et à l'influence des facteurs externes, leurs concentrations en caroténoïdes sont légèrement plus fortes (4,0 mg p. 100) que celles des grains du bas de l'épi (3,8 mg), les différences portant sur les xanthophylles comme sur les carotènes (GROGAN et BLESSIN, 1973).

TABLEAU 8

Composition vitaminique du mil Pennisetum en fonction de la taille du grain(*)

	Gros grains	Petits grains	Différence (p. 100)
Poids des 1 000 grains (g)	14,8	3,15	
Insoluble formique (g p. 100)	3,0	4,3	+ 45
Thiamine (mg p. 100)	0,44	0,34	— 23
Riboflavine (mg p. 100)	0,23	0,27	+ 15
Niacine (mg p. 100)	1,77	2,39	+ 35
Pantothénate Ca (mg p. 100)	0,79	1,04	+ 32

(*) D'après SAMSON et ADRIAN (1971).

Une autre cause de variation est le degré de développement des grains. Le fait est particulièrement apparent dans certaines céréales, comme le mil pennisetum (ou mil chandelle) dont les épis sont très fournis et dans lesquels la totalité des grains n'atteint pas son plein épanouissement. Dans trois variétés de mil, les productions ont été classées en fonction de la granulométrie des grains, ce qui a permis de faire apparaître des différences appréciables entre les grains les plus gros et ceux de très faible taille. Il faut souligner que le poids des grains variait dans un rapport approchant 5 à 1 (tabl. 8) (SAMSON et ADRIAN, 1971).

Teneurs moyennes et signification nutritionnelle

Après ce qui vient d'être mis en relief, il peut paraître illusoire et sans objet de rechercher une composition vitaminique moyenne des céréales. Nous pensons cependant que de telles valeurs — manipulées avec discernement — permettent de fixer un ordre de grandeur et de situer l'intérêt des céréales sur un plan général.

C'est pourquoi nous donnons, avec prudence, des valeurs susceptibles d'être considérées comme « moyennes », tirées principalement des données de DICKS (1949) ANGLADETTE (1966) et de KARLIN *et al.* (1966) (tabl. 9).

Les céréales contiennent pratiquement de la vitamine E et les vitamines du groupe B à l'exclusion de la vitamine B12, les autres facteurs étant totalement absents ou à des taux insignifiants pour le consommateur.

De plus, les apports en vitamines B et E sont assez irréguliers. D'une manière générale, les céréales entières sont des sources appréciables de thiamine et de pyridoxine : 100 g de grains renferment au moins 1/3 de la quantité nécessaire journellement à l'adulte.

Leur niveau en Équivalents-niacine varie grandement d'une céréale à l'autre. Enfin, dans l'ensemble les céréales sont des sources médiocres de vitamine B2 et de vitamine E.

De plus, en ce qui regarde l'alimentation humaine, le potentiel contenu dans le grain entier est loin de bénéficier en totalité au consommateur.

Localisation des vitamines dans le grain

L'hétérogénéité du grain de céréale est bien connue : on oppose classiquement la pauvreté de l'endosperme en éléments nutritionnels à la richesse des fractions périphériques. Cette distinction s'applique en particulier aux facteurs vitaminiques.

D'une manière quelque peu schématique, les vitamines liposolubles sont concentrées dans le germe en raison de sa concentration en lipides, la vitamine B1 est localisée très sélectivement dans le scutellum, une annexe de l'embryon, et la plupart des autres facteurs vitaminiques B se trouvent dans les couches d'aleurone.

Localisation des vitamines dans le blé

La répartition des vitamines dans le blé répond tout à fait à ce qui vient d'être décrit sommairement : le scutellum (2 p. 100 du grain) renferme à lui seul les 2/3 de la thiamine, les couches d'aleurone (6,5 p. 100 du grain) contiennent entre 25 et 75 p. 100 des vitamines B. A l'inverse l'amande et le germe lui-même sont pauvres en ces facteurs (tabl. 10). Il faut souligner que le péricarpe proprement

TABLEAU 9

Composition vitaminique moyenne du grain entier des céréales et estimation des besoins vitaminiques de l'homme(*)

	Facteurs vitaminiques								
	Carotène	Vit. E	Vit. B1	Vit. B2	Niacine	Equiv.-niacine utilisables	Vit. B6	Acide folique	Biotine
Teneurs (mg p. 100 g) :									
blé tendre	(0,1)	3,0	0,6	0,09	6,5	5,5	0,4	0,035	0,01
blé dur	(0,2)	3,0	0,5	0,09	5,5	6,0	0,5	0,04	0,01
riz	Traces	2,0	0,35	0,06	5,0	6,0	0,5	0,06	0,01
maïs blanc	0,0								
maïs jaune	0,03-0,70	5,0	0,4	0,09	2,5	3,0	0,7	0,01	0,008
sorgho	0,0-0,03	?	0,4	0,15	4,0	4,0	0,5	?	0,025
mil pennisetum	Traces	?	0,35	0,15	3,0	5,0	?	?	?
orge	?	2,0	0,5	0,09	9,5	6,0	0,65	0,04	0,015
Besoins (mg par jour) :									
enfant (2-3 ans)		10,0	0,6	0,7		8,0	0,6		
adolescent (16 ans)		25,0	1,25	1,5		18,0	1,8		
adulte (30 ans)		27,5	1,2	1,6		15,0	2,0		
adulte (65 ans)		27,5	1,1	1,6		13,5	2,0		

(*) Valeurs établies d'après diverses sources.

dit est à peu près dépourvu de vitamines; en conséquence les vitamines qui seront trouvées dans les sons industriels proviennent essentiellement des particules d'aleurone demeurant fixées au péricarpe.

Les teneurs vitaminiques des fractions pures du grain reflètent la localisation des facteurs dans les diverses portions : c'est ainsi que le scutellum isolé renferme 15 mg de thiamine pour 100 g : teneur tout à fait exceptionnelle puisque la consommation de 10 g de ce dérivé céréalier suffirait à couvrir le besoin de l'adulte en vitamine B1. On sait malheureusement qu'au plan industriel l'isolement du scutellum représente une difficulté considérable.

TABLEAU 10

Localisation des vitamines dans le grain de blé(*)

	Péricarpe	Aleurone	Germe	Scutellum	Amande
Répartition (p. 100 de la vitamine totale) :					
thiamine	1	24	2,5	68,5	3,5
riboflavine	4,5	37	11,5	14,5	32,5
niacine	3	74	1	1	20,5
pyridoxine	12	59,5	8	11,5	9
pantothénate de Ca	8,5	41	3,5	4	43,5
Teneurs (mg p. 100) :					
thiamine	0,05	1,65	0,85	15,6	0,02
riboflavine	0,1	1,0	1,4	1,25	0,07
niacine	2,3	68,0	4,4	3,8	1,3
pyridoxine	0,6	3,6	2,1	2,3	0,05
pantothénate Ca	0,8	4,5	1,7	1,4	0,4
caroténoïdes	—— 0,1 ——		0,95		0,02
tocophérols	—— 7,5 ——		30,0		1,8

(*) *in* ADRIAN et PETIT (1970).

De même, les couches d'aleurone seraient une excellente source de vitamines, notamment de niacine et de vitamine B6, tandis que la farine d'amande pure ne contient que des teneurs vitaminiques minimes (tabl. 10).

En ce qui concerne la vitamine E, localisée dans le germe, on doit mentionner la richesse de l'huile de germe de blé en ce facteur : près de 300 mg p. 100 ml, alors que l'huile d'arachide n'en fournit que 45 mg environ (ADRIAN et JACQUOT, 1968) et le beurre de l'ordre de 3 mg (ADRIAN, 1973*b*). Avant la production industrielle de vitamines E, le germe des céréales était une des meilleures sources de tocophérols.

Par ailleurs, selon MORAN (1959), la nature des tocophérols varie avec la fraction du grain, le α tocophérol prédominant dans le germe tandis que le ε tocophérol est abondant dans le péricarpe.

C'est dire que la vitamine E du germe a un pouvoir vitaminique élevé tandis que celle du péricarpe offre une forte activité anti-oxygène. A titre de comparaison une situation comparable se retrouve dans la graine d'arachide, autre organe de

réserve, dont le tégument externe contient des substances à propriétés anti-oxygène (ADRIAN et JACQUOT, 1968). Ces constituants renforcent la stabilité chimique des graines au cours de leur phase de stockage.

Localisation des vitamines dans les autres céréales

Ce qui vient d'être décrit à propos du blé s'applique à l'ensemble des céréales; mais pour nombre d'entre elles les connaissances demeurent très incomplètes.

On sait, par exemple, que la thiamine est toujours concentrée dans le scutellum : 85 p. 100 de la thiamine du maïs sont localisés dans cette fraction, 82 p. 100 dans le cas du seigle, 50 p. 100 dans le cas de l'orge et de l'avoine, etc. De même, les couches d'aleurone du mil pennisetum sont particulièrement riches en niacine (ADRIAN *et al.*, 1975), situation identique à celle du blé (KENT-JONES et AMOS, 1947; HEATHCOTE *et al.*, 1952).

TABLEAU II

Localisation des vitamines liposolubles dans le grain de maïs(*)

	Péricarpe	Germe	Amande	
			Farineuse	Cornée
Caroténoïdes totaux :				
en mg p. 100	1,22	0,95	1,71	2,88
en p. 100 du total :				
xanthophylles	93	81	91	90
carotènes	7	19	9	10
Tocophérols totaux :				
en mg p. 100 :				
maïs normal	2,8	55,0	3,0	
maïs opaque-2	2,6	58,9	1,2	
en p. 100 du total				
α tocophérol				
maïs normal	27	29	2	
maïs opaque-2	26	33	4	
α tocotriénol				
maïs normal	traces		29	
maïs opaque-2	traces		47	
γ tocophérol				
maïs normal	73	69	6	
maïs opaque-2	74	66	11	
γ tocotriénol				
maïs normal	traces		63	
maïs opaque-2	traces		32	
δ tocophérol				
maïs normal		17		
maïs opaque-2		12		

(*) D'après BLESSIN *et al.* (1963), GRAMS *et al.* (1970).

La répartition des facteurs liposolubles du maïs semble quelque peu particulière au vu des analyses de GRAMS *et al.* (1970) et de BLESSIN *et al.* (1963) (tabl. 11). Les caroténoïdes sont en prédominance dans l'amande, surtout si elle est cornée. Dans les diverses fractions, le rapport « xanthophylles/carotènes » est du même ordre de grandeur.

Si les tocophérols se trouvent essentiellement dans le germe, leur nature diffère de celles des constituants du blé. La forme prédominante est le γ tocophérol, abondant à la fois dans le péricarpe et dans le germe; en seconde position viennent les tocotriénols qui se situent dans l'amande (tabl. 11). Cette situation est assez éloignée de celle décrite par MORAN (1959) à propos des tocophérols du blé.

Conséquences

La concentration très sélective des vitamines dans les couches du grain offre trois types de conséquences :

— Lors des traitements technologiques, des pertes spécifiques seront enregistrées au fur et à mesure que tel constituant anatomique du grain sera éliminé de la fraction comestible.

— L'étude du sort des vitamines pendant une opération technologique constitue un indice relativement précis pour localiser une fraction du grain : le sort de la thiamine permet d'identifier la présence du scutellum, celui de la niacine joue le même rôle en ce qui concerne l'aleurone, et la présence des tocophérols est un des meilleurs tests pour estimer l'abondance du germe dans une fraction meunière.

— Enfin, certains des sous-produits de la meunerie peuvent être considérés comme des sources abondantes de tel ou tel facteur vitaminique. Cet aspect a perdu de son intérêt depuis que l'industrie offre des tonnages considérables de vitamines synthétiques. Néanmoins, dans les régions où les disponibilités demeurent limitées un tel fait devrait retenir l'attention.

Les vitamines au cours des opérations de première transformation

L'Homme ne consomme qu'exceptionnellement ses céréales sous forme entière : il se réserve la partie interne du grain en délaissant une part plus ou moins importante des couches périphériques.

Il fait appel à deux grands principes selon la nature de la céréale : si l'amande est farineuse, les techniques visent à briser le grain et à en récupérer la farine, ce que réalise la mouture sur cylindres cannelés. Si le grain est corné ou vitreux et, par conséquent, si l'amande résiste à des chocs mécaniques, la tendance est d'attaquer le grain par l'extérieur et d'en détacher les couches externes. Ce but peut être atteint par des passages sur abrasifs, par des « pelages » ou encore par pilage dans des mortiers.

On peut aussi envisager pour les céréales une technologie qui n'aboutisse pas à l'obtention de produits alimentaires, mais à la production de denrées biochimiques ayant des possibilités d'emploi plus vastes. Les céréales sont alors traitées par voie humide dans la perspective de disposer d'amidon, de gluten, etc.

Moutures entières

Le fait de transformer mécaniquement un grain en farine ne provoque aucun dommage significatif sur le plan vitaminique, quelle que soit la technique utilisée. Une preuve en a été fournie récemment en étudiant les procédés préhistoriques faisant appel à la meule dormante (ADRIAN *et al.*, 1967). Les conséquences nutritionnelles ne commencent qu'au moment où interviennent des opérations de blutage.

TABLEAU 12

Pourcentage de vitamine du grain retrouvé dans la farine, en fonction du taux d'extraction(*)

	Taux d'extraction		
	85	*70*	*60*
p. 100 de vitamine retrouvé :			
tocophérol	78	55	45
thiamine	84	24	15
riboflavine	56	35	30
pyridoxine	55	26	15
niacine	42	20	16
pantothénate Ca	67	44	37
ac. folique	53	31	25
biotine	44	21	11

(*) D'après MORAN (1959), THOMAS et TUNGER (1966*b*).

Moutures sur cylindres à cannelures

C'est le procédé classique pour obtenir la farine blanche à partir du blé tendre. Des études systématiques sur l'évolution des teneurs vitaminiques en fonction de l'intensité du blutage ont été réalisées notamment par MORAN (1959) et par THOMAS et TUNGER (1966*b*) dont les résultats sont condensés dans le tableau 12. Avec un taux d'extraction de 85 p. 100 environ la moitié des vitamines est perdue, avec un taux de 70 p. 100 la perte est de l'ordre de 75 p. 100 et avec un très fort blutage (taux d'extraction de 60 p. 100), la disparition des vitamines atteint fréquemment 80 p. 100.

D'une manière générale, la perte de vitamines croît avec l'intensité du blutage. Mais elle dépend de la localisation du facteur considéré à l'intérieur du grain et des possibilités de trouver dans la farine blutée des fragments d'assises protéiques et de germe. Aussi, pour certaines vitamines, les pertes sont immédiatement importantes, pour d'autres elles ne le deviennent que dans le cas de blutages intenses.

Ces disparitions de vitamines ne sont pas un phénomène isolé, elles sont parallèles à l'élimination des éléments cellulosiques et minéraux des grains.

Les farines blanches sont connues pour leur pauvreté vitaminique. Avec la mouture de type français, si la farine a un taux d'extraction de 60 p. 100 elle est gravement déficiente en vitamines par rapport au grain entier (tabl. 13) (KARLIN *et al.*, 1966). La technique américaine de mouture aboutit à un produit encore plus raffiné et plus démuni sur le plan vitaminique, il s'agit de la *patent flour* : ses concentrations vitaminiques sont 3 à 5 fois inférieures à celles du grain, CALHOUM *et al.*, 1960; POLANSKY et TOEPFER, 1971; SLOVER et LEHMANN, 1972) (tabl. 14)(*).

TABLEAU 13

Composition vitaminique des produits de mouture du blé tendre : mouture de type français à fort blutage(*)

	Blé entier	Produit de mouture			
		Farine blanche	Gros sons	Fins sons	Remoulages
p. 100 de grain	100	59	19	11	11
Teneurs (mg p. 100) :					
thiamine	0,485	0,30	0,76	1,06	0,81
niacine	6,63	1,27	26,2	6,77	2,42
pyridoxine	0,63	0,14	2,06	1,03	0,37
ac. folique	0,04	0,015	0,08	0,065	0,03
biotine	0,012	0,003	0,032	0,015	0,006

(*) D'après KARLIN *et al.* (1966).

A l'opposé, certains sous-produits offrent un intérêt vitaminique évident. Dans la technique française les vitamines se retrouvent principalement dans les gros sons et les fins sons : une large proportion de l'aleurone doit être associée aux gros sons étant donné la teneur de ce dérivé en niacine. Dans le diagramme américain, la richesse vitaminique va en ordre décroissant depuis le *bran* jusqu'à la *farina*. Les fortes concentrations en tocophérols enregistrées dans le *bran* et les *shorts* indiquent la présence d'une fraction du germe dans ces dérivés; hypothèse d'autant plus vraisemblable que le *germ* représente un pourcentage infime des produits de mouture et ne saurait correspondre à la fraction anatomique de l'embryon.

Dans certains cas, si le blutage n'est pas poussé trop loin, ou peut-être si la céréale se prête mieux à ce type de traitement, il est possible de recueillir des farines ayant conservé un potentiel vitaminique élevé. Ainsi, en traitant du sorgho sur un diagramme adapté à cette céréale RAYMOND *et al.* (1954) ont obtenu une farine dont la composition vitaminique n'accuse qu'un déficit de 40 p. 100 par rapport au grain entier.

(*) Il n'en découlera pas automatiquement un préjudice important pour le consommateur, la panification américaine faisant habituellement appel à différents adjuvants susceptibles de fournir un certain complément vitaminique (malt, poudre de lait, etc.).

TABLEAU 14

Composition vitaminique des produits de mouture du blé tendre : mouture de type américain(*)

	Blé entier	Produit de mouture							
		Bran (sons)	Shorts (remoulages)	Red dog (remoulages)	Germ (germe)	Low grade flour (farine basse)	First clear flour (farine)	Patent flour (farine fine-fleur	Farina (semoule)
p. 100 du grain	100	14,5	9,0	0,5	0,07	2,5	11,0	60,5	1,5
Teneurs (mg p. 100) :									
thiamine	0,395	0,63	1,34	2,8	1,35	1,10	0,25	0,08	0,04
riboflavine	0,105	0,33	0,35	0,32	0,49	0,12	0,05	0,03	0,03
niacine	5,45	26,6	16,0	8,0	4,55	3,85	2,10	1,0	0,88
pyridoxine	0,27	1,05	0,85			0,11		0,03	
pyridoxal	0,05	0,17	0,15			0,03		0,015	
pyridoxamine	0,045	0,18	0,18			0,025		0,01	
pantothénate Ca	1,09	3,91	2,66	1,82	1,04	0,92	0,68	0,48	0,44
acide folique	0,05	0,09	0,14	1,12	0,21	0,04	0,02	0,01	0,01
biotine	0,01	0,045	0,035	0,025	0,015	0,01	0,005	0,001	0,001
α tocophérol	1,1	1,74	4,72			1,20		0,28	
α tocotriénol	0,33	1,05	0,81			0,22		0,14	
β tocophérol	0,78	1,27	3,54			0,93		0,20	
β tocotriénol	2,87	6,40	4,81			2,43		2,18	

(*) D'après CALHOUN *et al.* (1960), POLANSKY et TOEPFER (1971), SOLVER et LEHMANN (1972).

Dans le cas du seigle, les résultats de THOMAS et TUNGER (1966*b*) laissent supposer soit une localisation très interne des vitamines dans cette céréale, soit (plus probablement) une plus grande friabilité des particules d'aleurone et de germe dont les brisures se retrouvent même dans les farines fortement blutées. Quel que soit le mécanisme en cause, la farine blanche de seigle offre une qualité vitaminique bien supérieure au produit correspondant issu du blé :

Taux d'extraction	p. 100 de la vitamine retrouvé dans la farine		
	Thiamine	Ribloflavine	Niacine
85.	86	62	85
70.	63	42	70
60.	60	37	60

Turboséparation des farines

A la mouture industrielle sur cylindres s'est adjointe la technique de turboséparation (ou classification par l'air) des farines. Un broyage très poussé constitue cependant une condition préliminaire indispensable pour aboutir à un résultat satisfaisant (JONES *et al.*, 1960; LECLERC, 1968). Ce broyage permet, en particulier, la pulvérisation des particules d'aleurone et de scutellum, d'où l'obtention de fractions riches en vitamines et en protéines (JONES *et al.*, 1960; GRACZA, 1959, 1960; LECLERC, 1968; LECLERC et COLAS, 1970) :

	Cendres (p. 100)	Protéines (p. 100)	Thiamine (mg p. 100)	Vitamine B6 (mg p. 100)
Farine initiale	0,78	3,5	0,365	0,115
Fraction « lourde »	0,87	4,3	0,445	0,125
Fraction « fine »	0,85	4,55	0,39	0,13
Fraction « moyenne »	0,63	2,5	0,245	0,08

Mouture sur cylindres en vue de l'obtention de semoules

Le blé dur, le maïs sont fréquemment traités en vue de la production de semoules. La même opération peut être réalisée avec d'autres céréales à grain non farineux.

Ce traitement permet de récupérer une partie plus importante des vitamines du grain, ainsi qu'il ressort de la comparaison établie dans le tableau 15 (TOEPFER *et al.*, 1972; FARRE-ROVIRA et COSTES, 1974).

En ce qui concerne les semoules et farines de maïs, leur coloration reflète fidèlement leur concentration en caroténoïdes (BENK, 1973). Comme les pigments

TABLEAU 15

Valeur vitaminique de la semoule de blé dur, en comparaison avec celle de la farine de blé tendre(*)

	Semoule de blé dur		Farine de blé tendre
	p. 100 du grain retrouvé	teneur (mg p. 100)	p. 100 du grain retrouvé
Thiamine	48	0,33	23
Riboflavine	88	0,095	32
Niacine totale	35	3,85	21
Niacine libre	47	2,25	30
Pyridoxine	24	0,08	9
Pyridoxal	31	0,02	25
Pyridoxamine	53	0,02	20
α tocophérol	30	0,30	3
α tocotriénol	37	0,26	22
β tocophérol	31	0,16	6
β tocotriénol	48	1,72	12
β carotène		0,52	
Lutéine		0,60	

(*) D'après TOEPFER *et al.* (1972), FARRE-ROVIRA et COSTES (1974).

sont abondants dans l'amande, la coloration n'est pas fonction de l'intensité du blutage mais uniquement des caractéristiques génétiques des grains traités.

Par contre, les tocophérols du maïs étant concentrés dans le germe, les produits de mouture comme les semoules se trouvent très appauvris en ce facteur (GRAMS *et al.*, 1971).

Le sorgho est également susceptible d'être traité dans une installation de semoulerie, avec d'autant plus de facilité qu'il s'agit de variétés entièrement vitreuses. Les semoules recueillies offrent un potentiel vitaminique élevé, représentant au moins 70 p. 100 des valeurs du grain entier (SITTI *et al.*, 1977).

Pilage au mortier de bois

Le traitement des céréales africaines au mortier de bois (mil pennisetum, sorgho et parfois riz) est une des traditions millénaires de ce continent. L'opération ne réussit que dans la mesure où les couches périphériques sont suffisamment humidifiées pour se détacher de l'amande sous l'effet des chocs produits par le pilon. De son côté, l'amande doit être aussi peu friable que possible.

Le procédé utilisé au Hoggar permet de récupérer jusqu'à 85 p. 100 de fraction comestible, composée de semoules et de farine : les semoules sont très pauvres sur le plan vitaminique et nutritionnel tandis que la farine est proche des farines bises industrielles et ses teneurs vitaminiques sont nettement plus élevées (tabl. 16) (ADRIAN *et al.*, 1967) : visiblement dans ce cas la farine fait figure de dérivé noble par rapport aux semoules. Ces conclusions ont été confirmées par FAVIER *et al.* (1972) en étudiant le sorgho traité par le même processus technologique.

TABLEAU 16

Composition vitaminique des produits du mil pennisetum traité au mortier de bois(*)

	Pourcentage du grain	Teneur (mg p. 100)		
		Thiamine	Riboflavine	Niacine
Grain entier	100	0,255	0,16	2,74
Son	14,2	1,05	0,555	5,61
Grosse semoule	40	0,25	0,07	0,78
Fine semoule	16	0,16	0,09	0,85
Farine	29,5	0,56	0,20	2,08

(*) D'après ADRIAN *et al.*, (1967).

Néanmoins, il existe certaines variantes à cette technique de base, et la plupart d'entre elles se révèlent très dommageables au point de vue vitaminique. Lorsque les céréales subissent des trempages et des lavages après avoir été pilées, ces opérations entraînent des pertes nutritionnelles élevées, dont l'importance est toujours en relation avec le taux d'extraction. L'exemple ci-dessous concerne des traitements pratiqués en Rhodésie et met en évidence l'ampleur des dégâts provoqués par les pertes de diffusion dans l'eau (CARR, 1961) :

	Traitement subi	Taux d'extraction	Teneurs (mg p. 100)	
			Thiamine	Riboflavine
Maïs	2 pilages, trempage et lavages	55	0,04	0,02

Blanchiment par abrasion et action mécanique

Les céréales à amande non farineuse sont susceptibles d'être également traitées par « abrasion » ou par « pelage », c'est-à-dire qu'elles sont débarrassées de leurs tissus externes par frottement. Le riz, classiquement « blanchi » par passages sur des cônes dont les surfaces sont recouvertes d'abrasifs, n'est pas la seule céréale apte à ce traitement. Des opérations quelque peu comparables ont été proposées pour le sorgho et pour le mil pennisetum (RAO *et al.*, 1958; ADRIAN *et al.*, 1975).

Dans le cas du riz, le scutellum et le germe proprement dit sont très rapidement éliminés, d'où une disparition quasi-totale des lipides, de la vitamine E et de la thiamine, les autres facteurs vitaminiques étant généralement moins touchés (KIK, 1945*b*; TOURY *et al.*, 1960; ANGLADETTE, 1966; GANDONNIÈRE-CHANCEL, 1962) (tabl. 17).

TABLEAU 17

Composition vitaminique du riz blanchi, directement ou après un traitement d'étuvage-convertissage(*)

	Riz blanchi normalement		Riz blanchi après étuvage-convertissage	
	Teneur (mg p. 100)	Perte par rapport au riz cargo (p. 100)	Teneur (mg p. 100)	Bénéfice de l'opération (p. 100)
Thiamine	0,045	85	0,19	320
Riboflavine	0,032	94	0,064	100
Niacine	1,18	73	3,55	200
Pyridoxine	0,04	6	0,10	150
Pantothénate Ca	0,56	48	1,00	80
Acide folique	0,015	75	0,02	35
Biotique	0,004	67	0,008	100

(*) établie à partir de diverses sources

Cette évolution, propre au riz, résulte également de la localisation de la thiamine à l'intérieur du grain : 78 p. 100 sont concentrés dans le péricarpe, l'aleurone et le scutellum, l'amande ne refermant que 9 p. 100 de la thiamine du riz (HINTON, 1948).

En raison de ce contexte particulier, le polissage du riz a la responsabilité majeure de l'étiologie du béribéri chez les populations consommatrices de riz blanchi. En soi, cette céréale n'est pas moins bien pourvue que les autres, mais le processus technologique qui lui est appliqué provoque une absence quasi-totale de thiamine dans la fraction comestible.

En conclusion, si le blanchiment du riz est une opération criticable sur le plan vitaminique, la responsabilité doit être imputée à l'anatomie du grain plus qu'à la technique elle-même.

Le même processus utilisé pour des grains de structure différente ne se traduit pas d'une façon aussi néfaste. Ainsi, du sorgho poli renferme encore 0,21 mg p. 100 de vitamines B1, valeur inférieure seulement de 30 p. 100 à celle du grain entier (RAO *et al.*, 1958).

Par des techniques voisines, de « pelage » des grains humidifiés, on a la faculté de récupérer des sous-produits céréaliers de valeur alimentaire élevée. Une démonstration en a été faite à l'aide du mil pennisetum dont il est possible d'isoler une farine correspondant sensiblement à l'aleurone et, par conséquent, riche en niacine (ADRIAN *et al.*, 1975).

Étuvage-convertissage (Parboiling)

Depuis longtemps, il existe en Asie une technique artisanale — maintenant industrialisée — permettant de conserver au riz blanchi une large proportion de ses vitamines initiales (AYKROYD, 1932; SERGENT, 1941, ANGLADETTE, 1966). Si

le procédé est utilisé surtout pour le riz, il peut être appliqué à de nombreux autres grains.

Il s'agit d'un étuvage-convertissage ou *parboiling* qui consiste à tremper le grain pendant quelques heures dans une eau tiède, puis à le soumettre à un traitement thermique sous pression (par exemple, 15 min. à 120°). Les modalités exactes conditionnent l'efficacité du procédé (KIK, 1945*a*; HINTON, 1948*a*; SABRY et TANNOUS, 1961; SUBBA RAO et BATTACHARYA, 1966; DEVADAS *et al.*, 1968; etc).

Cette opération permet aux vitamines hydrosolubles et à des constituants minéraux et vitaminiques de diffuser dans l'amande du grain et de s'y fixer. De plus, l'étuvage provoque une gélatinisation de l'amidon à la périphérie de l'amande, ce qui constitue une barrière protectrice pour les composants qui s'y trouvent retenus.

Une fois cette technique réalisée, le blanchiment s'effectue selon les modalités classiques, mais ses effets se trouvent atténués. De plus, au cours du lavage et de la cuisson ménagers, le riz étuvé conserve une plus grande proportion de ses vitamines en raison de la paroi d'amidon pré-gélatinisé qui borde le grain blanchi. Le bénéfice de l'étuvage-convertissage du riz apparaît pleinement dans le tableau 17 établi à partir des données de GANDONNIÈRE-CHANCEL, (1962) et le tableau 18 qui condense de nombreuses observations (DONE, 1949; PADUA et JULIANO, 1974; SWAMINATHAN, 1941 et 1942; etc).

TABLEAU 18

Évolution de la thiamine au cours de la préparation du riz : bénéfice de l'étuvage-convertissage(*)

	Traitement normal	Étuvage-convertissage
Perte pendant le blanchiment (p. 100 du riz cargo) :		
1er cône	82	21
2e cône	15	15
3e cône	2	10
perte totale	99	46
Perte pendant la préparation ménagère (p. 100 du riz blanchi) :		
lavage du riz blanchi	55	11
cuisson	22	25
perte totale	77	36

(*) Établie à partir de diverses sources.

Il a été aussi avancé que le bénéfice retiré de l'opération résulte d'une meilleure adhésion du scutellum et des couches d'aleurone à l'amande, ce qui leur permet d'être présentes dans le grain blanchi.

Quoi qu'il en soit, une quantité de 500 g de riz étuvé-converti fournit la moitié du besoin journalier en thiamine, alors que le grain blanchi directement n'en apporte que 8 p. 100.

	Bouteille brune	Sac de jute
Riz	— 1	— 40
Autres céréales	+ 6	+ 5

Pendant ce temps, on enregistre une synthèse de riboflavine, signalée également par BRENNER *et al.* (1948), qui est nettement supérieure dans le riz. L'ensemble de ces faits indique une plus forte activité biochimique et probablement enzymatique dans le riz que dans les autres céréales.

Rôle des déprédateurs

Les insectes qui attaquent les grains n'en consomment pas la totalité mais préférentiellement certaines fractions. Dans cette éventualité, la perte est à la fois quantitative et qualitative, le produit détérioré présentant une composition différente de celle du grain initial.

De l'ensemble des travaux relatifs à cette question (HOWE, 1965; VENKAT RAO *et al.*, 1958; PINGALE *et al.*, 1954 et 1957; etc.) il ressort les points suivants :

— on dénote généralement une perte de thiamine, sans que l'évolution des autres vitamines soit précisée. Cette disparition peut résulter de la consommation préférentielle de la région du scutellum par les insectes; elle peut être aussi la conséquence d'une plus grande exposition à la chaleur des grains perforés par les déprédateurs.

— on enregistre par ailleurs un accroissement de l'acidité provenant d'une activité lipolytique et d'une libération d'acides gras. Cette observation renforce l'idée d'une attaque sélective de l'embryon par les insectes.

Cette double évolution de la thiamine et de l'acidité du grain est illustrée dans le tableau 21 (PINGALE *et al.*, 1954). Nul doute que cette acidification ne se traduise rapidement en une oxydation qui entraînera une destruction des vitamines liposolubles oxydables. Mais ce dernier point ne semble pas avoir fait l'objet de recherches précises.

TABLEAU 21

Évolution du blé contaminé par les insectes après 6 mois de stockage(*)

	Acidité (mg p. 100)	Thiamine (mg p. 100)
Blé avant stockage.	19	0,45
Blé stocké sans insectes	37	0,42
Blé infesté avec *Calandra oryzae*	44	0,18
Blé infesté avec *Trogoderma granaria*	46	0,20
Blé infesté avec *Ephestia cautella*	49	0,17

(*) D'après PINGALE *et al.* (1954).

On retrouve la même évolution dans le cas du riz, mais l'ampleur des phénomènes dépend du processus de transformation appliqué antérieurement : le riz étuvé converti paraît plus stable — c'est-à-dire moins sensible à l'attaque par les insectes — que les autres formes de riz (PINGALE *et al.*, 1957).

Évolution dans la farine

Lorsque le grain est converti en farine, la conservation devient plus aléatoire. En plus des risques précédemment notés — qui se trouvent amplifiés — il existe des possibilités d'oxydation.

La perte de thiamine peut atteindre un niveau élevé grâce à des échanges thermiques facilités : en 1 mois de stockage la vitamine B1 peut accuser une destruction dépassant 25 p. 100 (SHASHKINA, 1973).

L'oxydation résulte essentiellement de la nature des acides gras des céréales : dans l'huile de germe environ 80 p. 100 sont énoïques et plus de la moitié sont des acides gras polyénoïques : ils sont donc exposés à un risque considérable d'oxydation. Faute de précautions particulières l'huile de germe est très instable. A l'exposition à l'air, l'acidité croît de façon importante et la teneur en tocophérols diminue très significativement. Selon une observation ancienne, les 2/3 des tocophérols disparaissent en un mois. Cette situation explique la destruction de la moitié des tocophérols de la farine en l'espace de 3 mois, à 37° il est vrai (ROTHE *et al.*, 1958). Les carotènes sont à leur tour fortement endommagés, le préjudice étant naturellement proportionnel à l'extension de l'oxydation : à température ordinaire, une farine conservée pendant 3 mois perd ainsi 1/4 de ses carotènes, la proportion étant moindre si on réduit les risques (conservation au froid ou sous atmosphère inerte) (FERRARI et BAILEY, 1929; NAZAROV *et al.*, 1972*b*).

Les agents blanchissants de nature oxydante (par exemple, le peroxyde de chlore) renforcent l'oxydation et le taux de destruction des facteurs liposolubles (FRAZER *et al.*, 1956; MOORE *et al.*, 1957, 1958; MASON et JONES, 1958).

Les conséquences d'une telle évolution visent à la fois la qualité nutritionnelle des farines et leur valeur commerciale — dans le cas des produits céréaliers teintés (semoules de maïs, de blé dur) — dont la coloration est recherchée par le consommateur.

Action des rayons gamma

La stabilisation des matières alimentaires par l'irradiation γ a fait l'objet de nombreuses études. On sait que ces techniques ne peuvent être utilisées qu'à faibles doses, sinon elles provoquent une altération importante de la qualité nutritionnelle et organoleptique des denrées traitées.

En ce qui concerne les céréales, un traitement de 20 à 50 krads, en vue de la désinsectisation des graines n'a pratiquement aucune répercussion fâcheuse dans le domaine des vitamines B selon les observations d'EGIAZAROV (1959), de LE CLERC (1963) et d'ADRIAN et FRAYSSINET (1975). Par contre, avec des doses de 500 krads, les pertes vitaminiques deviennent très appréciables (POISSON *et al.*, 1962; WASHÜTTL, 1969, 1971) (tabl. 22).

TABLEAU 22

Pourcentage de pertes vitaminiques au cours de l'irradiation γ des produits céréaliers(*)

Vitamine	Produit irradié	Intensité de l'irradiation	
		50 krad	500 krad
Thiamine	Farine de blé	10	26
Niacine	Farine de blé	0	28
Niacine	Blé	5	4
Tryptophane	Blé	3	28
α tocophérol	Avoine	10	36
α tocotriénol	Avoine	4	49

(*) D'après POISSON *et al.* (1962), WASHÜTTL (1969, 1971).

Les vitamines au cours des opérations de seconde transformation

Les transformations technologiques subies par les semoules et les farines sont très nombreuses, mais elles se rattachent à quelques grands types opératoires :

— Il y a habituellement une phase préliminaire de malaxage et de pétrissage qui vise à homogénéiser et hydrater les constituants. Elle s'accompagne notamment d'un risque d'oxydation.

— Suit fréquemment une phase de fermentation, spontanée ou provoquée, qui est susceptible de modifier le potentiel en vitamines B par suite d'une synthèse ou d'une consommation de ces facteurs.

— Le troisième stade est la cuisson. Elle peut avoir lieu en milieu humide (bouillie, mie de pain) ou en atmosphère sèche et à température élevée (grillage de la croûte de pain, de la biscotte, etc.). Ce sont ces dernières modalités qui se révèlent les plus néfastes sur le plan vitaminique.

Dans ce domaine technologique, les modes opératoires et les types d'installation sont des données importantes; aussi, l'extrapolation des résultats obtenus dans des conditions déterminées ne doit être pratiquée qu'avec prudence et esprit critique.

Malaxage et pétrissage

L'opération s'accompagne d'une oxydation portant sur les tocophérols (MOORE *et al.*, 1957) et les composants oxydables de la phase lipidique (DRAPRON *et al.*, 1974). Dans les conditions normales, le pétrissage est responsable de l'oxydation de 1/3 de l'acide linoléique et des α et ε tocophérols (tabl. 23). Si on a recours au procédé moderne de pétrissage intensifié — qui incorpore une quantité supérieure d'air dans la pâte — l'oxydation s'en trouve accrue de façon notable.

La disparition des tocophérols entraîne à son tour une destruction des caroténoïdes; s'ils sont peu touchés dans la technique traditionnelle, ils sont très fortement endommagés par le pétrissage intensifié (DRAPRON *et al.*, 1974).

TABLEAU 23

Pourcentage de perte d'acide linoléique et de tocophérols selon le mode de pétrissage(*)

	Ac. linoléique	α tocophérol	β tocophérol	ϱ tocophérol
Pétrissage normal : . . .				
après pétrissage	35	40	0	35
après fermentation . .		40	10	40
après cuisson (mie) . .		70	15	55
Pétrissage intensifié :				
après pétrissage . . .	95	100	35	70
après fermentation . .		100	55	70
après cuisson (mie) . .		100	70	85

(*) D'après DRAPRON *et al.* (1974).

L'oxydation de ces pigments est également notée lors du pétrissage des produits de blé dur en vue de la fabrication des nouilles et des macaronis, la perte s'étalant entre 30 et 75 p. 100 (SCHETTINO et DE LIETO, 1968; NAZAROV et EGOROVA, 1972). La diminution de la coloration qui en découle va à l'encontre de la qualité commerciale de ces productions. Pour pallier cet inconvénient, il a été proposé de pétrir sous vide (NAZAROV et EGOROVA, 1972*a*) ou d'avoir recours à des substances protectrices (NAZAROV *et al.*, 1972*b*, 1974).

Les effets décrits sont proportionnels à la concentration en lipoxygénase de la pâte, enzyme présente aussi bien dans les graines de céréales que dans celles de légumineuses (DRAPRON et UZZAN, 1968). Sous l'effet conjoint de la lipoxygénase et du pétrissage intensifié, l'acide linoléique, la vitamine E et les caroténoïdes sont détruits en totalité.

Cette oxydation ne retentit pas sur les éléments hydrosolubles oxydables, comme, par exemple, la vitamine B6.

Des observations analogues sont faites sur des procédés de panification en continu (tabl. 24), opération endommageant fortement les vitamines liposolubles sans altérer les facteurs hydrosolubles (SLOVER *et al.*, 1969; POLANSKY et TOEPFER, 1969).

Fermentation panaire

Les levures sont riches en vitamines du groupe B, ce qui fait que leur incorporation à la farine se traduit bénéfiquement à condition que le levurage soit quelque peu élevé. Dans la boulangerie classique, l'introduction de 1,0 à 1,5 p. 100 de levure fraîche ne provoque pas un enrichissement significatif de la pâte; par contre, dans les procédés modernes (qui demandent un taux de levure plus élevé) ou dans la biscotterie, la levure utilisée contribue à élever le potentiel vitaminique (ADRIAN et PETIT, 1970).

Selon le travail de DRAPRON, déjà cité, la fermentation ne modifie pas les teneurs en vitamines liposolubles.

En ce qui concerne les facteurs hydrosolubles, les faits paraissent moins nettement établis : en panification française, PETIT (1950) avait observé une stabilité de

TABLEAU 24

Composition vitaminique du pain selon son mode de fabrication(*)

	Teneurs (mg p. 100)	
	Procédé normal	Procédé en continu
α tocophérol	0,04	traces
β tocophérol	0,02	0,01
γ tocophérol	0,24	0,04
δ tocophérol	0,11	0,04
β tocotriénol	0,18	0,11
Vitamine B6 totale . . .	0,056	0,057

(*) D'après SLOVER *et al.* (1969), POLANSKY et TOEPFER (1969).

la concentration en thiamine, tandis que KENNEDY et JOSLYN (1966) et VODOVA-CAPROVA et HOUBOVA (1959) concluent à une augmentation des teneurs en vitamines B. Il est bien certain que les taux de levurage et les modalités exactes de la phase fermentaire peuvent aboutir à des résultats divergents. Dans certains cas, il peut même exister une certaine consommation des vitamines de la farine par la levure, tandis qu'à l'inverse le développement microbiologique peut être suffisamment intense pour engendrer des synthèses vitaminiques à un taux significatif.

La fermentation retentit indiscutablement sur la forme de certaines vitamines : la levure a le pouvoir de phosphoryler la vitamine B1 (PETIT, 1950) et la vitamine B6 (POLANSKY *et al.*, 1964). Ceci transforme des vitamines — à l'état libre dans la farine — sous des formes douées d'une haute efficacité physiologique. Mais ces dérivés phosphorylés offrent une plus grande fragilité thermique. Indirectement la levure est responsable d'une aggravation éventuelle des pertes vitaminiques au cours des cuissons.

Autres types de préparations

Il n'est pas possible de passer sous silence un certain nombre de préparations artisanales qui constituent encore de nos jours le fondement de l'alimentation pour de vastes populations.

Diverses préparations subissent des fermentations d'intensité variable, ce qui tend parfois à élever leur potentiel en vitamines B, mais à l'intérieur de limites assez étroites (ADRIAN et SAYERSE, 1954; AKINRELE, 1970; OSIFO, 1971; BHAT et PURI, 1971; etc.).
Parfois même, des produits apparemment fermentés accusent un appauvrissement en ces facteurs (ADRIAN *et al.*, 1974), dû probablement au développement de souches consommatrices de vitamines B.

Reste la *tortilla* d'Amérique centrale dans laquelle on a voulu voir le remède empirique à la pellagre. Sa fabrication consiste à tremper le grain de maïs dans un lait de chaux à température assez élevée; puis après un séjour de plusieurs heures, le maïs est lavé, pilé et cuit à l'état de galette ou de crèpe : c'est la tortilla.

Le lait de chaux transforme la niacine combinée du maïs en forme physiologiquement active (LAGUNA et CARPENTER, 1951; CRAVIOTO *et al.*, 1952; KODICEK *et al.*, 1956, 1959; PEARSON *et al.*, 1957, etc.). Malgré cet avantage apparent, la tortilla ne peut être très efficace dans la lutte contre la pellagre et la malnutrition en général car sa fabrication entraîne des pertes par diffusion dans l'eau et des destructions sous l'effet du pH alcalin : on ne retrouve après l'opération que 90 p. 100 des protéines du maïs, 80 p. 100 des caroténoïdes, 70 p. 100 de la niacine, 60 p. 100 de la riboflavine et 40 p. 100 de la thiamine (PEARSON *et al.*, 1957; TAGLE *et al.*, 1963; BRESSANI *et al.*, 1958).
En bref, la proportion de niacine utilisable augmente mais la quantité absolue de vitamine PP diminue.

Il demeure infiniment probable que l'absence de pellagre dans certaines populations d'Amérique centrale consommatrices de maïs est due à un apport de niacine sous d'autres formes; on peut penser à la cacahuète (*in* ADRIAN et JACQUOT, 1968) et surtout au café (ADRIAN, 1972).

Cuisson

Dans le domaine vitaminique, la conséquence la mieux étudiée des chauffages est la destruction de la thiamine, chef de file des vitamines thermolabiles.

Destruction de la thiamine

La perte de thiamine croît rapidement avec une élévation de la température (FARRER, 1955; DWIVEDI et ARNOLD, 1972), mais l'intensité du phénomène est également sous la dépendance de facteurs physico-chimiques dont certains interviennent dans le cas des produits céréaliers (DWIVEDI et ARNOLD, 1973) :

— les formes phosphorylées, comme la cocarboxylase synthétisée au cours de la fermentation panaire, sont 4 à 10 fois plus sensibles que la vitamine libre (PETIT, 1950).

— la perte devient importante dès que le pH atteint la neutralité; elle est considérable dans les pH faiblement alcalins;

— elle passe par une intensité maximale pour des hydratations faibles, de l'ordre de 10 p. 100 (MOSSMANN *et al.*, 1973).

Ces conditions sont extrêmement proches de celles qui sont propices à la réaction de Maillard, à laquelle la thiamine peut participer en raison de sa fonction aminée (MILLER *et al.*, 1962; Van der POEL, 1956).

En pratique, l'importance du pH de la pâte, du rapport « volume /surface » du pâton (qui détermine la durée de la cuisson et les possibilités de pénétration thermique) ont été mis en évidence par SCHULTZ *et al.* dès 1942.

a) Rôle du pH de la pâte :

En raison de sa réaction acide, le pain constitue normalement un milieu favorable au maintien de la thiamine. Il n'en va plus de même si on a recours à des levures chimiques(*) à réaction fortement alcaline (PACE et WHITACRE, 1953*a*) :

(*) Les *levures chimiques* ou *poudres levantes* ne sont pas utilisées en boulangerie, mais seulement dans certaines fabrications industrielles et ménagères de biscuiterie.

Bicarbonate ajouté (g)	pH de la pâte	pH du pain	Perte de thiamine (p. 100)
1,9	5,75	6,1	15
3,5	6,25	7,35	27
4,5	6,4	7,95	60
5,5	6,55	8,2	81

A noter que l'élévation du pH survient au cours de la cuisson, au moment où le bicarbonate se décompose. Un tel phénomène a été précisé à plusieurs reprises (BARACKMAN, 1942; BRIANT et HUTCHINS, 1946; MIKULICIC *et al.*, 1960).

Il convient de souligner que toute variation du pH, dans un sens ou dans l'autre, retentit sur le comportement de la thiamine. Ainsi, dans la confection de biscuits au lait, la substitution du lait ordinaire par un lait acidifié accroît la stabilité de la vitamine (PACE et WHITACRE, 1953*b*) :

	Biscuit au :	
	Lait ordinaire	Lait acidifié
pH de la pâte.	6,50	5,95
pH du biscuit	7,4	6,1
Thiamine conservée (p. 100) . .	46,5	83,5

b) *Importance de l'exposition à la chaleur :*

La taille et la forme du pain déterminent la durée de la cuisson et, en conséquence, l'intensité de la destruction de la vitamine B1 : plus le pain est gros ou épais, plus la cuisson devra être prolongée et plus les effets thermiques seront marqués. Nous sommes dans la même situation que dans la conserverie où les pertes dues à la stérilisation des boîtes sont proportionnelles aux dimensions des récipients.

Des pâtons de 525 g sont beaucoup plus exposés à une dégradation de la thiamine que de petits pâtons de 30 g (ZAEHRINGER et PERSONIUS, 1949) :

	Gros pain		Petit pain	
Coloration de la croûte	Pâle	Foncée	Pâte	Foncée
Perte en eau (p. 100)	11,5	17,0	15,5	22,0
Perte en thiamine (p. 100)	17	26	7	16

Dans le cas de produits laminés (biscuits minces), la destruction de la vitamine B1 — au contraire — est d'autant plus importante que l'épaisseur de la pâte est plus mince (CHAUDRI et MULLER, 1974). Ce résultat s'explique par la pénétrabilité thermique dans la couche du biscuit.

c) Destruction de la thiamine dans le pain :

On peut considérer que la perte moyenne de vitamine B1 dans le pain se situe entre 10 et 20 p. 100 (HOFFMAN *et al.*, 1940; SCHULTZ *et al.*, 1942; PETIT, 1950; COPPOCK, 1956; HERMANN et TUNGER, 1966). On pourrait admettre une valeur de 15 p. 100 dans le cas de pains cuits au moule et de 20 p. 100 pour ceux qui sont déposés directement sur la sole.

Si on ne retient que la croûte, beaucoup plus exposée à une température élevée la disparition dépasse 50 p. 100 (tabl. 25).

Évolution des autres vitamines

Les renseignements demeurent rares en ce qui concerne les facteurs autres que la thiamine. Le sort des tocophérols a fait l'objet d'observations divergentes (DRAPRON *et al.*, 1974, SLOVER et LEHMANN, 1972)

Les facteurs thermolabiles autres que la thiamine sont exposés à des dégradations susceptibles d'être importantes si on se base sur les résultats de POLANSKY et TOEPFER (1971) et de BUTTERFIELD et CALLOWAY (1972) : au cours de la cuisson on perd 35 p. 100 de l'acide folique et 22 p. 100 de la vitamine B6 totale. Derrière ce dernier chiffre se dissimule un certain nombre de mécanismes. La pyridoxine, très stable, n'est pas dégradée tandis que le pyridoxal — forme particulièrement labile — disparaît à raison de 50 p. 100, une fraction étant convertie en pyridoxamine, ainsi que cela se produit classiquement pendant les traitements thermiques (SNELL et RANNEFELD, 1945).

D'autres phénomènes concernent divers facteurs vitaminiques, ils vont être passés en revue, mais il faut souligner que l'évolution des vitamines pendant la cuisson du pain demeure encore fragmentaire.

Influence du mode de chauffage du four

Tous les résultats donnés jusqu'ici découlent des conditions habituelles de la boulangerie, faisant appel à des fours chauffés par conduction ou convexion.

Avec un chauffage aux infra-rouges (3 à 4 p. 100 de lumière visible), le pain est cuit beaucoup plus rapidement (30 mn au lieu de 55 mn), mais les conséquences d'ordre vitaminique sont particulières (GASSMANN et SCHNEEWEISS, 1959) (tabl. 25): outre la perte classique de thiamine, on enregistre une destruction massive de riboflavine dans la partie de la croûte exposée aux radiations, donc à une lumière visible.

Avec le chauffage classique comme avec les infra-rouge, les portions les plus exposées à la chaleur accusent une très forte augmentation de niacine, phénomène sur lequel nous reviendrons.

Grillage, toastage et extrusion

Lorsque les tranches de pain sont transformées en biscottes ou en toasts, de nouvelles pertes de facteurs thermolabiles se surajoutent à celles qui viennent d'être décrites. L'acide folique est endommagé à raison de 5 à 25 p. 100 (BUTTER-

TABLEAU 25

Teneurs vitaminiques de la croûte de pain en fonction du mode de chauffage du four de boulangerie(*)

	Nature de la croûte	
	dessus du pain	dessous du pain
Pourcentage de variation par rapport à la mie :		
THIAMINE :		
cuisson ordinaire	— 72	— 76
cuisson infra-rouge	— 67	— 47
RIBOFLAVINE :		
cuisson ordinaire	— 2	— 9
cuisson infra-rouge	— 62	0
NIACINE :		
cuisson ordinaire :	+ 62	+ 33
cuisson infra-rouge	+ 81	+ 36

(*) D'après GASSMANN et SCHNEEWEISS (1959).

FIELD et CALLOWAY, 1972) et la destruction de la thiamine peut atteindre 30 p. 100 (DOWNS et MECKEL, 1943; COPPOCK *et al.*, 1956).

L'intensité des destructions dépend de trois facteurs :

— les possibilités de pénétration thermique, conditionnées par l'épaisseur, la porosité du produit grillé;

— la quantité de chaleur appliquée : après 30 sec. de toastage, la perte de thiamine est inférieure à 10 p. 100 alors qu'elle est de 25 p. 100 après 65 sec.;

— l'humidité du produit exerce une action très importante : une humidité de l'ordre de 10 p. 100 intensifie les manifestations de la réaction de Maillard en provoquant un brunissement et une chute de la qualité protidique. Parallèlement la destruction de la thiamine s'accroît de façon spectaculaire. Dans un grillage de 40 sec. à 320°, la destruction de la thiamine est de 25 p. 100 avec un taux d'humidité de 20 p. 100 (supérieur à l'activité maximale), mais elle atteint 75 p. 100 lorsque la teneur en eau est de 10 p. 100 (zone de réactivité optimale) (MOSSMAN *et al.*, 1973).

Mais les chauffages intenses engendrent au moins une conséquence bénéfique sur le plan vitaminique : une synthèse d'acide nicotinique.

Le tableau 25 a montré le phénomène survenant dans la croûte de pain. Il se produit de façon analogue au cours du grillage de nombreuses graines, céréales et légumineuses (NANAVATY et GUMASHTA, 1964) et tout particulièrement lors de la torréfaction du café (ADRIAN, 1963, 1972).

Cette production de niacine s'effectue à partir d'un précurseur, la trigonelline, qui se déméthyle à hautes températures (VIANI et HORMAN, 1974).

Par ailleurs, si le pH est alcalin le traitement thermique est également favorable à la niacine, mais en faisant appel à un tout autre mécanisme : dans ces conditions, les formes combinées d'acide nicotinique deviennent très aisément actives sur le plan physiologique.

Au cours de la cuisson de « crèpes » à haute température, lorsque le pH de la pâte s'élève de 6,8 à 9,6 ,le taux de niacine inutilisable biologiquement tombe de 77 à 0 p. 100 (CLEGG, 1963).

Une telle technique constitue une arme appréciable dans la lutte contre la pellagre, mais il ne faut pas oublier le revers de la médaille : dans ces conditions la thiamine a toutes les probabilités d'être détruite en totalité!

Enfin, on demeure extrêmement mal renseigné sur les conséquences de l'extrusion dans le domaine vitaminique. La thiamine, comme la riboflavine, seraient fortement touchées par cette technique, le préjudice paraissant en relation avec l'intensité de l'activité mécanique de l'installation (nombre de tours par minute). La disparition de la thiamine serait fonction de la température, tandis que la riboflavine paraît sensible à l'hydratation du mélange (BETNER *et al.*, 1974).

Néanmoins, aussi bien en ce qui concerne l'extrusion que les autres techniques modernes de chauffage (et de séchage), les travaux demeurent trop peu nombreux pour définir avec certitude les effets de ces processus technologiques sur les vitamines des produits traités. Dans ce domaine, des études systématiques interdisciplinaires peuvent seules répondre aux questions qui restent posées.

Reçu pour publication en juin 1978.

Summary

Vitamins in cereals and cereal products

Cereals contain vitamin E in the embryo, thiamine in the scutellum, niacin in the aleurone layers, and other vitamins B in outer portions of grain. Apart from the niacin and perhaps the biotin, their efficiency seems satisfactory. The pellagrogenic properties of maize are mainly imputable to aminoacid deficiencies.

If the grain is stored intact, its potentiality of vitamins remains stable. But if it is infested by insects, both vitamin B1 and E are damaged.

The vitamin amounts of refined flour are three or four times weaker than those of grain. The polish rice has lost 9/10 of its thiamine, except if it has undergone a parboiling treatment.

The kneading provokes an oxidation of liposoluble vitamins. This risk increases when modern procedures are used. The baking damages the thermolabile vitamins B. The roastings are favourable to the synthesis and the efficiency of niacin.

Références bibliographiques

ADRIAN J., 1963. Synthèse de la niacine au cours de la torréfaction du café et son efficacité biologique. *Café, cacao, thé*, **7**, 359-367.

ADRIAN J., 1969*a*. Extraction chimique de la vitamine PP du maïs en vue de son dosage microbiologique. *Ann. nutrit. alim.*, **23**, 141-150.

ADRIAN J., 1969*b*. Teneur en tryptophane et en vitamine PP des produits végétaux alimentaires de l'Afrique intertropicale. *Ann. nutrit. alim.*, **23**, 233-252.

ADRIAN J., 1972. La consommation de café et la pellagre. *Ann. Hyg. langue française. Med. et nutrit.*, **8**, 71-80.

ADRIAN J., 1973*a*. Efficacité de la niacine dans les rations à base de maïs et d'avoine. *Intern. J. vit. nutrit. res.*, **43**, 327-338.

ADRIAN J., 1973*b*. Valeur alimentaire du lait, 1 vol., Paris, La Maison Rustique édit.

ADRIAN J., SAYERSE C., 1954. Les mils et les sorghos, monogr. ORANA, Gouvern. Général AOF édit., Dakar; *idem*,1957. Composition of Senegal millets and sorghums. *Brit. J. nutrit.*, **11**, 99-105.

ADRIAN J., JACQUOT R., 1964. Le sorgho et les mils en alimentation humaine et animale, 1 vol., Paris, Vigot Fr. édit.

ADRIAN J., FRANGNE R., DAVIN A., GALLANT D., GAST M., 1967. Le problème de la mouture du mil. Intérêt nutritionnel des procédés artisanaux africains et essai de mécanisation. *Agron. trop.*, **22**, 687-698.

ADRIAN J., FRANGNE R., BOULENGER P., DAVIN A., GALLAND D., ABEL H., GUILBOT A., GAST M., 1967. Bilan et intérêt nutritionnel de différents procédés de mouture du mil. *Cahier nutrit. diet.*, **2**, 67-77.

ADRIAN J., JACQUOT R., 1968. Valeur alimentaire de l'arachide et de ses dérivés. 1 vol., Paris, Maisonneuve et Larose édit.

ADRIAN J., LUNVEN P., CARNOVALE E., 1969. L'alpiste. 1 L'alpiste des oiseaux (*Phalaris canariensis* L.), une source exceptionnelle de tryptophane. *Ann. nutrit. alim.*, **23**, 299-312.

ADRIAN J., MURIAS de QUEIROS M. J., FRANGNE R., 1970*a*. La vitamine PP dans les graines de céréales et de légumineuses. *Ann. nutrit. alim.*, **24**, 155-166.

ADRIAN J., FRANGNE R., 1970*b*. L'alpiste. 2 Rôle de l'alpiste des oiseaux (*Phalaris canariensis* L.) et du sorgho (*Sorghum* sp) dans les rations maïdiques. *Ann. nutrit. alim.*, **24**, 1-9.

ADRIAN J., PETIT L., 1970*c*. Les vitamines des céréales et leur évolution au cours des traitements technologiques. *Ann. nutrit. alim.*, **24**, B131-B168.

ADRIAN J., DRAPRON R., LEFEBVRE J., MERCIER C., STEPHANOPOULOS O. I., 1974. Ames-trachanas : produits céréaliers lactés. *Chemika chronica* (*Athènes*), **39**, 193-197; *idem.* 1974. Valeur alimentaire du « trahana-amita » grec, pâte alimentaire lactée. Comm. 12e congr. intern. Indust. Alim,. Athènes, avril, 39-50.

ADRIAN J., GOUSSAULT B., ARNAL-PEYROT F., SAMSON F., SAMSON M. F., 1975. Techniques de mouture du mil pennisetum et valeur protidique des semoules et des farines. *Agron. trop.*, **30**, 43-51; *idem. Alimentation et Vie*, **63**, 250-264.

ADRIAN J., FRAYSSINET C., 1975. La désinsectisation des céréales et des légumineuses africaines par l'irradiation gamma. *Alimentation et Vie*, **63**, 265-272.

AKINRELE I. A., 1970. Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *J. sci. food agric.*, **21**, 619-625.

ANGLADETTE A., 1966. Le riz, 1 vol. Paris, Maisonneuve et Larose édit.

AURICH H., 1960. Ueber den Gehalt von proteinogenen Aminosaüren und B-vitaminen in Maisquellwasser. *Nahrung*, **4**, 31-41.

AYKROD W. R., 1932. The effect of parboiling and milling on the antineuritic vitamin (B1) and phosphate content of rice. *J. hyg.*, **32**, 184-194.

BAINS G. S., 1953. Effect of commercial fertilizers and green manure of yield and nutritive value of wheat. *Cereal chem.*, **30**, 139-145.

BARACKMAN R. A., 1942. Thiamin retention in self-rising flour biscuits. *Cereal chem.*, **19**, 121-128.

BEETNER G., TSAO T., FREY A., HARPER J., 1974. Degradation of thiamine and riboflavin during extrusion processing. *J. food sci.*, **39**, 207-208.

BENK E., 1973. Carotingehalt in gelbem Mais. *Gordian*, **73**, 140.

BHAT C. M., PURI B., 1971. Nutritive value of maize as affected by home processing. *Indian J. nutrit. diet.*, **8**, 325-328.

BLESSIN C. W., BRECHER J. D., DIMLER R. J., 1963. Distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn. *Cereal chem.*, **40**, 582-586.

BOISSELOT-LEFEBVRES J., BALLUE D., ADRIAN J., 1977*a*. Efficacité de la niacine dans les régimes à base de zéine. *Intern. J. vit. nutrit. res.*, **47**, 23-31.

BOISSELOT-LEFEBVRES J., ADRIAN J., 1977*b*. Efficacité de diverses vitamines B dans les régimes à base de zéine. *Intern. J. vit. nutrit. res.*, **47**, 32-39.

BOISSELOT-LEFEBVRES J., GERBAUD-BALLUE D., ADRIAN J., 1978. Le rôle de la leucine dans l'efficacité nutritionnelle de la niacine. *Intern J. vit. nutrit. res.*, **48**, 145-151.

BORROW A., FOWDEN L., STEDMAN M. M., WATERLOW J. C., WEBB R. A., 1948. A growth retarding factor in maize bran. *Lancet*, **2**, 752-753.

BRENNER S., WODICKA V. O., DUNLOP S. G., 1948. Effect of high temperature storage on the retention of nutrients in canned foods. *Food technol.*, **2**, 207-221.

BRESSANI R., PAZ y PAZ R., SCRIMSHAW N. S., 1958. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J. agric. food chem.*, **6**, 770-774.

BRIANT A. M., HUTCHINGS M. R., 1946. Influence of ingredients on thiamine retention and quality in baking powder biscuits. *Cereal chem.*, **23**, 512-520.

BUTTERFIELD S., CALLOWAY D. H., 1972. Folacin in wheat and selected foods. *J. amer. diet. Assoc.*, **60**, 310-314.

CAILLEAU R., KIDDER L. E., MORGAN A. F., 1945. The thiamine content of raw and parboiled rices. *Cereal chem.*, **22**, 50-60.

CALHOUN W. K., HEPBURN F. N., BRADLEY W. B., 1960. The distribution of the vitamins of wheat in commercial mill products. *Cereal chem.*, **37**, 755-761.

CARBALLIDO A., LORENTE V., CENTENO M. C., 1971. Contribution al conocimiento de la composicion del maiz. *Anales bromatol.*, **23**, 291-309.

CARR W. R., 1961. Observations on the nutritive value of traditionally ground cereals in Southern Rhodesia. *Brit. J. nutrit.*, **15**, 339-343.

CAUSERET J., MOCQUOT G., 1964. Thermo et radiosensibilité des vitamines. *Ann. nutrit. alim.*, **18**, C267-C354.

CHAUDHURI D. K., 1962. Anti-thiamine activity in rice. *Sci. cult.*, **28**, 384-385.

CHAUDHURI D. K., 1964. Purification of anti-thiamine factor from rice bran. *Sci. cult.*, **30**, 97-98.

CHITRE R. G., DESAI D. B., RAUT V. S., 1955. The nutritive value of pure bred strains of cereals and pulses. 1. Thiamine, riboflavin and nicotinic acid contents of 107 pure bred strains of cereals and pulses. *Indian J. med. res.*, **43**, 575-583; *idem*. The effect of storage on thiamine, riboflavin and nicotinic in cereals and pulses. *Indian J. med. res.*, **43**, 585-589.

CHEN K. T., GEDDES W. F., 1945. Studies on the wheat pigments. Thesis Univ. Minnesota, St Paul.

CHRISTIANSON D. D., WALL J. S., DIMLER R. J., BOOTH A. N., 1968. Nutritionally unavailable niacin in corn. Isolation and biological activity. *J. agric. food chem.*, **16**, 100-104.

CLEGG K. M., HINTON J. J. C., 1958. The microbiological determination of vitamin B6 in wheaten flour, and in fractions of the wheat grain. *J. sci. food agric.*, **9**, 717-721.

CLEGG K. M., 1963. Bound nicotinic acid in dietary wheaten products. *Brit. J. nutrit.*, **17**, 325-329.

COPPOCK J. B. M., CARPENTER B. R., KNIGHT R. A., 1956. Cereal product fortification. The B vitamins, with special reference to thiamine losses in baked products. *J. sci. food. agric.*, **7**, 457-464.

CRAVIOTO R. O., MASSIEU G. H., CRAVIOTO O. Y., DE FIGUEROA F. M., 1952. Effect of untreated corn and Mexican tortilla upon the growth of rats on a niacintryptophan deficient diet. *J. nutrit.*, **48**, 453-459.

DAS M. L., GUHA B. C., 1960. Isolation and chemical characterization of bound niacin (niacinogen) in cereal grains. *J. biol. chem.*, **235**, 2971-2976.

DAWSON E. R., MARTIN G. W., 1941. Vitamin B1 estimation in yeast and bread and stability during breadmaking *J. soc. chem. ind.*, **60**, 241-245.

DEVADAS R. P., PUNITHAVATHI V. V., KANNAN A., 1968. Comparison of the nutritive value of differently processed parboiling rice. *J. nutrit. diet.*, **5**, 306-308.

DICKS M. W., 1965. Vitamin E content of foods and feeds for human and animal consumption. *Agric. exp. stat., Univ. Wyoming*, bull. n° 435, pp. 194.

DONE J., 1949. The effects of various treatments of paddy rice on the aneurin and nicotinic acid content of the milled grain. *Brit. J. nutrit.*, **3**, 335-345.

DOWNS D. E., MECKEL R. B., 1943. Thiamin losses in toasting bread. *Cereal chem.*, **20**, 352-355.

DRAPRON R., UZZAN A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. nutrit. alim.*, **22**, B393-B436.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEOFFROY J., ADRIAN J., 1974. Répercussions de l'action de la lipoxygénase en panification. Destruction des acides gras essentiels à l'état libre; des caroténoïdes et des tocophérols. Altération du goût du pain. *Ann. technol. agric.*, **22**, 353-365.

DWIVEDI B. K., ARNOLD R. G., 1972. Chemistry of thiamine degradation. Mechanisms of thiamine degradation in a model system. *J. food sci.*, **37**, 886-888.

DWIVEDI B. K., ARNOLD R. G., 1973. Chemistry of thiamine degradation in food products and model systems: a review. *J. agric. food chem.*, **21**, 54-60.

EGIAZAROV G. M., 1959. Radiosynthesis of vitamins C and B1 in some foodstuffs. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **128**, 1070-1072.

FARRE-ROVIRA R., COSTES C., 1974. Les caroténoïdes des farines et semoules de blé. *Physiol. veg.*, **12**, 251-288.

FARRER K. T. H., 1955. The thermal destruction of vitamin B1 in foods. *Adv. food res.*, **6**, 257-311.

FAVIER J. C., CHEVASSUS-AGNES S., JOSEPH A., GALLON G., 1972. La technologie traditionnelle du sorgho au Cameroun. Influence de la mouture sur la valeur nutritive. *Ann. nutrit. alim.*, **26**, 221-250.

FERRARI C. G., BAILEY C. H., 1929. The determination of carotin in flour. *Cereal chem.*, **6**, 347-371, 457.

FRAZER A. C., HICKMAN J. R., SAMMONS H. G., SHARRATT M., 1956. Lipid changes and vitamin content of treated flours. *J. Sci. food agric.*, **7**, 375-380; *idem*, The biological properties of untreated, normally treated and overtreated flours. *J. sci. food agric.*, **7**, 464-470.

FRIGG M., 1976. Bio-availability of biotin in cereals. *Poultry sci.*, **55**, 2310-2318.

GANDONNIÈRE-CHANCEL J., 1962. Le riz de Camargue. Thèse Pharmacie, Marseille.

GASSMANN B., SCHNEEWEISS R., 1959. Die Vitamine B1, B2, E und PP im profil normal und infrarot gebackeuer Brote. *Nahrung*, **3**, 42-54.

GAST M., ADRIAN J., 1965. Mils et sorghos en Ahaggar. Monographie CRAPE, Alger.

GOPALAN C., 1969. Possible role for dietary leucine in the pathogenesis of pellagra. *Lancet*, **1**, 197-199.

GOPALAN C., SRIKANTIA S. G., 1960. Leucine and pellagra. *Lancet*, **1**, 954-957.

GRACZA R., 1959. The subsieve-size fractions of a soft wheat flour produced by air classification. *Cereal chem.*, **36**, 465-487.

GRACZA R., 1960. The subsieve-size fractions of a hard red spring wheat flour produced by air classification. *Cereal chem.*, **37**, 579-593.

GRAMS G. W., BLESSIN C. W., INGLETT G. E., 1970. Distribution of tocopherols within the corn kernel. *J. amer. oil chem. soc.*, **47**, 337-339.

GRAMS G. W., BLESSIN C. W., INGLETT G. E., 1971. Distribution of tocopherols in wet- and dry-milled corn product. *Cereal chem.*, **48**, 356-359.

GROGAN C. O., BLESSIN C. W., 1973. Stability of carotenoids in the kernels of maize. *Canad. J. plant. sci.*, **53**, 507-510.

HARPER A. E., PUNEKAR B. D., ELVEHJEM C. A., 1958. Effect of alkali treatment on the availability of niacin and aminoacids in maize. *J. nutrit.*, **66**, 163-172.

HEATHCOTE J. G., HINTON J. J. C., SHAW B., 1952. The distribution of vitamin PP in wheat and maize. *Proc. roy soc.*, **139**, 276-287.

HERBST A. M., 1963. Zum Vitamin- und Aminosaüregehalt von Maisquellwasser. *Stärke*, **15**, 142-143.

HERRMANN J., TUNGER L., 1966. Zur Kinetik der Vitamin B1 Zerstörung in Weizenbrot aus Mehlverschiedener Ausmahlung. *Nahrung*, **10**, 401-407.

HERTING D. C., DRURY E. J. E., 1969. Alpha-tocopherol content of cereal grains and processed cereals. *J. agric. food chem.*, **17**, 785-790.

HINTON J. J. C., 1947. The distribution of vitamin B1 and nitrogen in the wheat grain. *Proc. roy. soc.*, **134**, 418-429.

HINTON J. J. C., 1948*a*. The distribution of vitamin B1 in the rice grain. *Brit. J. nutrit.*, **2**, 237-241.

HINTON J. J. C., 1948*b*. Parboiling treatment of rice. *Nature*, **162**, 913-915.

HINTON J. J. C., PEERS F. G., SHAW B., 1953. The B-vitamins in wheat: the unique aleurone layer. *Nature*, **172**, 993-995.

HOFFMAN C., SCHWEITZER T. R., DALBY G., 1940. The loss of thiamin in bread on baking and toasting. *Cereal chem.*, **17**, 737-739.

HOWE R. W., 1965. Losses caused by insects and mites in stored foods and feed-ingstuffs. *Nutrit. Abstr. Rev.*, **35**, 285-303.

HUGOT D., SUSCHETET M., LHUISSIER M., LECLERC J., CAUSERET J., 1971. Valeur nutritionnelle de blés conservés pendant une longue durée. *Cahier nutrit. diet.*, **6**, 79-80.

JACQUOT R., TERROINE T., CREVEUX-BOURGEAT J., CHARCONNET F., ADRIAN J., 1950. Le problème du maïs. Les interrelations tryptophane-niacine. *Arch. sci. physiol.*, **4**, 115-143.

JAHN-DEESBACH W., MAY H., 1972. Der Einfluss von Sorte und Stickotoff. Spätdungung auf den Thiamin-gehalt des Weizenkornes sowie der verschiedenen Mehltypen und Mühlen Nachprodukte. *Z. für Acker Pflanzenbau*, **135**, 1-18,

JONES C. R., FRAZER J. R., MORAN T., 1960. Vitamin contents of air classified high- and low protein flour fractions. *Cereal chem.*, **37**, 9-18.

JUSTIN-BESANCON L., LWOFF A., 1942. Vitamine antipellagreuse et avitaminoses nicotiniques, 1 vol., Paris, Masson édit.

KARLIN R., GUERILLOT-VINET S., LE CLERC A. M., ADRIAN J., 1966. Influence des conditions de production, de récolte et de stockage sur la composition biochimique des céréales. Vitamines. *Ann. nutrit. alim.*, **20**, 221-233.

KENNEDY B. M., JOSLYN M. A., 1966. Changes in iron, thiamine, and riboflavine content of flour during dough formation and baking. *Baker's dig.*, **40**, n° 4, 60-62, 64, 88.

KENT-JONES D. W., AMOS A. J., 1947. Modern cereal chemistry, 1 vol., Liverpool, The Northern Publishing.

KIK M. C., 1945*a*. Effect of parboiling on thiamine in rice. *Cereal chem.*, **23**, 529-539.

KIK M. C., 1945*b*. Effect of milling, processing, washing, cooking and storage on thiamine, riboflavin and niacin in rice. *Arkansas agric. exp. stat. Bull.*, n° 458, pp. 60.

KIK M. C., 1957. Nutritive value of rice and its by-products. *Arkansas Univ. agric. exp. stat. Bull.*, n° 589, pp. 24.

KLYUSHKINA Y. F., DENISENKO Y. I., NECHAYEV A. P., YANATOVSKY M. T., 1970. Study of the composition of pigments and tocopherols of rye lipids. *Priklad. Biokhim. Microbio.*, **6**, 95-98.

KODICEK E., BRAUDE R., KON S. K., MITCHELL K. G., 1956. The effect of alkaline hydrolysis of maize on the availability of its nicotinic acid to the pig. *Brit. J. nutrit.*, **10**, 51-67.

KODICEK E., WILSON P. W., 1959. The availability of bound nicotinic acid to the rat. The effect of lime-water treatment of maize and subsequent baking into « tortilla ». *Brit. J. nutrit.*, **13**, 418-430; Chaudhuri D. K., Kodicek E., 1960. The effect of treating wheat, rice and barbey brans and a purified preparation of bound nicotinic acid with sodium hydroxide. *Brit. J. nutrit.*, **14**, 35-42.

KODICEK E., WILSON P. W., 1960. Niacytin, a bound vorm of nicotinic acid in wheat bran. *Biochem. J.*, **76**, 27P-28P.

KOVATS T. L., KRASZNER-BERNDORFER E., HUNYADVARI E., 1970. *Elelm. Ipar.*, **24**, 302-305.

KREHL W. A., 1949. Niacin in aminoacid metabolism. *Vit. and Hormones*, **7**, 111-146.

KREHL W. A., ELVEHJEM C. A., STRONG F. M., 1944. The biological activity of a precursor of nicotinic acid in cereal products. *J. biol. chem.*, **156**, 13-19.

LAGUNA J., CARPENTER K. J., 1951. Raw versus processed corn in niacin-deficient diets. *J. nutrit.*, **45**, 21-28.

LE CLERC A. M., 1963. Effets des radiations ionisantes sur la teneur en vitamines de quelques produits alimentaires. *Ann. nutrit. alim.*, **17**, B449-B461.

LECLERC J., 1968. Influence de la turboséparation de la farine sur les teneurs des fractions en quelques vitamines du groupe B. *Ann. nutrit. alim.*, **22**, 33-35.

LECLERC J., COLAS A., 1970. Répartition des vitamines du blé en mouture sur cylindres et en classification par air. *Ind. alim. agric.*, **87**, 711-718.

LEPAGE M., SIMS R. P. A., 1968. Carotenoids of wheat flour: their identification and composition. *Cereal chem.*, **45**, 600-604.

LORENZ K., LIMJAROENRAT P., 1974. The alpha-tocophérol content of triticales and triticale-milling fractions. *Lebens. Wiseenschaft. Technol.*, **7**, 86-88

LUCE W. G., PEO E. R. jr, HUDMAN D. B., 1966. Availability of niacin in wheat for swine. *J. nutrit.*, **88**, 39-44.

MACEDA C., MILLAR-DAYRIT M., 1949. The loss of thiamine on storage of a native variety of rice as determined by the thiochrome method. *Acta med. phil.*, **6**, 113-120.

MASON E. L., JONES W. L., 1958. The tocopherol contents of some Australian cereals and flour milling products. *J. sci. food agric.*, **9**, 524-527.

MIKULICIC V., PENDE A., FILAJDIC M., 1960. Thiamine losses in biscuit manufacture. *Kem. ind. (Zagreb)*, **9**, 301-306.

MILLER C. S., SPRAGUE J. M., KRAMPITZ L. O., 1962. The reaction of thiamine with carbonyl compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**, art. 2, 401-411.

MOORE T., CHARMAN I. M., WARD R. J., 1957. The destruction of vitamin E in flour by chlorine dioxide. *J. sci. food agric.*, **8**, 97-104; *idem.*, 1958. Flour and bread, prepared with or without treatment with chlorine dioxide, as long-term sources of vitamin E for rats. *Brit. J. nutrit.*, **12**, 215-226.

MORAN T., 1959. Nutritional significance of recent work on wheat, flour and bread. *Nutrit. Abst. Rev.*, **29**, 1-16.

MOSSMAN A. P., ROCKWELL W. C., FELLERS D. A., 1973. Hot air toasting and rolling whole wheat. *J. food sci.*, **38**, 879-884.

NANAVATY K., GUMASHTA A., 1964. Effect of cooking procedures on the free and total niacin content of certain foodstuffs. *J. nutrit. diet.*, **1**, 276-280.

NAZAROV N. I., EGOROVA N. I., 1972*a*. Preventing the oxidation of carotenoids during vacuum processing of farinaceous products. *Khlebop. Kondit. Prom.*, **16**, n° 5, 24-25.

NAZAROV N. I., EGOROVA N. I., KONDRATENKO S. S., 1972*b*. Effect of surface-active materials on carotenoids content of pasta. *Khlebop. Kondit. Prom.*, **16**, n° 2, 20.

NAZAROV N. I., ROZANTSUR E. G., KONDRATENKO S. S., EGOROVA N. I., 1974. Carotenoid stabilization in spaghetti dough by modified starch and tamol. *Izvest. Vyssk. Ucheb. Zaved. Pishch. Technol.*, **1**, 148-150.

NAUMOVIC O., NAUMOVIC M., 1973. Thiamine, tocopherol and carotene contents in various types of maize. *Hrama. Ishrana*, **14**, 130-136.

NICHOLLS L., 1947. Thiamine of milled raw and parboiled rice. *Nature*, **160**, 298.

NIWA S., KATAYAMA N., GOTO N., SANO K., OKAMOTO M., 1956. Enriched bread. *Eiyo zasshi.*, **14**, n° 2, 29-35.

OSIFO B.O.A., 1971. Vitamin B content of maize and maize products. Riboflavin and niacin. *Indian J. nutrit. diet.*, **8**, 17-21.

PACE J. K., WHITACRE J., 1953*a*. The relation of pH to the retention of thiamine, riboflavin and niacin in corn bread. *Food res.*, **18**, 231-238.

PACE J. K., WHITACRE J., 1953*b*. Retention of thiamine in corn muffins made with commercial mixes and in corn bread made with self-rising meals. *Food res.*, **18**, 245-249.

PADUA A. B., JULIANO B. O., 1974. Effect of parboiling on thiamine, protein and fat of rice. *J. sci. food agric.*, **25**, 697-701.

PEARSON W. N., STEMPFEL S. J., VALENZUELA J. S., UTLEY M. H., DARBY W. J., 1957. The influence of cooked vs. raw maize on the growth of rats receiving a 9 per cent. casein ration. *J. nutrit.*, **62**, 445-463.

PETIT L., 1950. Contribution à l'étude du dosage et de la répartition de l'aneurine dans le blé, la farine et le pain. *Ann. agron.*, **20**, 5-71.

PINGALE S. V., NARAYANA RAO M., SWAMINATHAN M., 1954. Effect of insect infestation on stored grain. 1 Studies on soft wheat. *J. sci. food agric.*, **5**, 51-54.

PINGALE S. V., KADROL B. S., NARAYANA RAO M., SWAMINATHAN M., SUBRAHMANYAN V., 1957. Effect of insect infestation on stored grain. 2 Studies on husked, hand-pounded and milled raw rice and parboiling milled rice. *J. sci. food agric.*, **8**, 512-516.

VAN DER POEL G. H., 1956. Participation of B-vitamins in non-enzymatic browning reactions. *Voeding*, **17**, 452-455.

POISSON J., JEMMALI M., CAHAGNIER B., LECLERC J., 1967. Traitement des farines de blé par irradiation gamma : comportement de leur microflore et de leur teneur en vitamine B1. *Meunerie franç.*, n° 240, 13-24.

POLANSKY M. M., MURPHY E. W., TOEPFER E. W., 1964. Components of vitamin B6 in grains and cereal products. *J. assoc. off. agric. chem.*, **47**, 750-753.

POLANSKY M. M., TOEPFER E. W., 1969. Nutrient composition of selected wheats products. 4 Vitamin B6 components. *Cereal chem.*, **46**, 664-674.

POLANSKY M. M., TOEPFER E. W., 1971. Effects of fumigation on wheat in storage. 3. Vitamin B6 components of wheat and wheat products. *Cereal chem.*, **48**, 392-396.

QUACKENBUSCH F. W., FINCH J. G., BRUNSON A. M., HOUSE L. R., 1963. Carotenoid, oil, and tocopherol content of corn inbreds. *Cereal chem.*, **40**, 250-259.

RANDOIN L., BILLAUD S., 1961. Le riz. *Alimentation et Vie*, **49**, 3-63.

RAO M. N., SUR G., SWAMINATHAN M., SUBRAHMANYAN V., 1958. Effect of milling on the nutritive value of jowar. *Ann. biochem. exp. med.*, **18**, 27-32.

RAO P. V. S., BHATTACHARYA K. R., 1966. Effet of parboiling on thiamine content of rice. *J. agric. food chem.*, **14**, 479-482.

RAYMOND W. D., SQUIRES J. A., WARD J. B., 1954. The milling of sorghum in Nigeria. *Colonial plant. anim. prod.*, **4**, 152-155.

ROTHE M., FELDHEIM W., THOMAS B., 1958. Vitamin E und Getreide. 3 Tocopherol und Carotinoidverluste bei Hitzeeinwirkung und Lagerung. *Ernährungsforsch.*, **3**, 386-399.

SABRY Z. I., TANNOUS R. I., 1961. Effect of parboiling on the thiamine, riboflavin, and niacin contents of wheat. *Cereal chem.*, **38**, 536-539.

SAMSON M. F., ADRIAN J., 1971. Composition biochimique du grain de *Pennisetum typhoideum* en fonction de la granulométrie. *Agron. trop.*, **26**, 1090-1099.

SARACOGLU S., 1953. The thiamine content of Turkish wheats and corresponding Bulgares. *Cereal chem.*, **30**, 323-327.

SCHETTINO O., DE LIETO A., 1968. Loss of colour in macaroni products. *Technica molit.*, **19**, 557-565.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., FREY C. N., 1941. A preliminary survey of the vitamin B1 content of American cereals. *Cereal chem.*, **18**, 106-113.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., FREY C. N., 1942. The stability of vitamin B1 in the manufacture of bread. *Cereal chem.*, **19**, 532-538.

SEELEY R. D., 1958. *in* Altschul A. M., Processed plant protein foodstuffs, 1 vol., New York, Academic Press.

SEN N. P., ROBINSON A. D., 1963. The absence of thiamine phosphates from cereals. *Canad. J. biochem. physiol.*, **41**, 97-100.

SERGENT E., 1941. Recherches expérimentales sur la vitamine antinévritique B1 dans le riz blanc et dans le riz étuvé. *Arch. Inst. Pasteur Alger*, **19**, 193-197.

SHASHKINA Z. N., 1973. Thiamine losses during wheat flour processing and storage *Izvest. vyssh. uchebn. zaved. pishch. technol.*, **4**, 37-38.

SITTI A., ADRIAN J., PILON R., 1977. Bilan nutritionnel de la mouture de deux sorghos africains à l'aide d'un diagramme de semoulerie. *Alimentation et Vie.*, **65**, 287-295.

SLOVER H. T., LEHMANN J., VALIS R. J., 1969. Nutrient composition of selected wheats and wheat products. 3 Tocophérols. *Cereal chem.*, **46**, 635-641.

SLOVER H. T., LEHMANN J., 1972. Effects of fumigation on wheat in storage. 4 Tocopherols. *Cereal chem.*, **49**, 412-415.

SNELL E. E., RANNEFELD A. N., 1945. The vitamin activity of pyridoxal and pyridoxamine for various organisms. *J. biol. chem.*, **157**, 475-489.

SOMERS G. F., BEESON K. C., 1948. The influence of climate and fertilizer practices upon the vitamin and mineral content of vegetables. *Adv. food. res.*, **1**, 291-324.

SUBBA RAO P. V., BHATTACHARYA K. R., 1966. Effect of parboiling on thiamine content of rice. *J. agric. food chem.*, **14**, 479-482.

SWAMINATHAN M., 1941. The effect of washing and cooking on the nicotinic acid content of raw and parboiled rice. *Indian J. med. res.* **29**, 83-88.

SWAMINATHAN M., 1942. The effect of washing and cooking on the vitamin B1 content of raw and parboiled milled rice. *Indian J. med. res.*, **30**, 409-416.

TAGLE M. A., BALLESTER D., DONOSO G., 1963. Efecto antipelagroideo del « mote » de maiz y de trigo. *Arch. venezuel. nutric.*, **13**, 93-106.

TEPLY L. J., STRONG F. M., ELVEHJEM C. A., 1942. Nicotinic acid, pantothenic acid and pyridoxine in wheat and wheat products. *J. nutrit.*, **24**, 167-174.

THOMAS B., TUNGER L., 1966*a*. Beiträge zur Aufstellung von richtwerten für den Vitamin- und Mineralstoffgehalt von Brotgetreidemehlen als Funktion des Ausmahlungsgrades. 1. Roggenmehl. *Nahrung*, **10**, 85-91.

THOMAS B., TUNGER L., 1966*b*. Beiträge zur Aufstellung von richtwerten für den Vitamin- und Mineralstoffgehalt von Brotgetreidemehlen als Funktion des des Ausmahlunggsgrades. 2. Weizenmehl. *Nahrung*, **10**, 185-194.

TOEPFER E. W., POLANSKY M. M., EHEART J. F., SLOVER H. T., MORRIS E. R., HEPBURN F. N., QUACKENBUSCH F. W., 1972. Nutrient composition of selected wheats and wheat products. *Cereal chem.*, **49**, 173-186.

TOURY J., BUSSON F., LUNVEN P., LANZA J., CARBIENER R., 1960. Variations dans la composition chimique d'un riz africain au cours de l'usinage. *Ann. nutrit. alim.*, **14**, 219-224.

VENKAT RAO S., NUGGEHALLI R. N., SWAMINATHAN M., PINGALE S. V., SUBRAHMANYAN V., 1958. Effect of insect infestation on stored grain. 3 Studies on kaffir corn (*Sorghum vulgare*). *J. sci. food agric.*, **9**, 837-839.

VIANI R., HORMAN I., 1974. Thermal behavior of trigonelline. *J. food sci.*, **39**, 1216-1217.

VINACKE W. R., 1951. The effects of storage, washing and cooking on the thiamine content of rice. *J. home econ.*, **43**, 641-643.

VODOVA-CAPKOVA M., HOUBOVA V., 1959. Vitamins and mineral substances in cereals. 1 Rye. *Sbornik Ceskoslov. Akad. zemedel. ved. rostlinna vyroba.*, **5**, 1571-1582.

WAGSTAFF R. K., DOBSON D. C., ANDERSON J. C., 1961. Available biotin content of barley. *Poultry sci.*, **40**, 503-509.

WARD R. J., 1958. The biological activities of ε and ξ tocopherols. *Brit. J. nutrit.*, **12**, 226-231.

WASHUTTL J., 1969. Der Gehalt an δ tocopherol und δ tocotrienol in unbestrahlten und α bestrahlten Hafer Körnern. *Ernährungs Umschau*, **16**, 474-475.

WASHUTTL J., 1971. Untersuchungen uber den Gehalt an freiem und gebundenem Tryptophan im Weizen nach δ Bestrahlung. *Ernährungs Umschau.*, **18**, 98-100.

WILDFEUER I., ACKER L., 1968. Ueber die Bestimmung von Carotinoiden in Teigwaren und deren Rohstoffen. *Mitt. Geb. Lebensmittel Unters. Hyg.*, **59**, 392-400.

WOOLLEY D. W., 1945. Production of nicotinic acid deficiency with 3-acetylpyridine, the ketone analogue of nicotinic acid. *J. biol. chem.*, **157**, 455-459.

WOOLLEY D. W., 1946. Reserval by tryptophane of the biological effects of 3-acetylpyridine. *J. biol. chem.*, **162**, 179-180; *idem*. The occurence of a « pellagrogenic » agent in corn. *J. biol. chem.*, **163**, 773-774.

ZAEHRINGER M. V., PERSONIUS C. J., 1949. Thiamine retention in bread and rolls baked to different degrees of browness. *Cereal chem.*, **26**, 384-392.

p. 917

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1978

J. ADRIAN. — Les vitamines des céréales et des produits céréaliers 873
C. ALAIS, G. HUMBERT, S. E. CHUON. — Étude bactériologique et biochimique du procédé de stérilisation par friction A.T.A.D. appliqué aux produits laitiers 739
M. BELLAL, J. BOUDRANT, C. CHEFTEL. — Réacteur enzymatique tubulaire à glucoamylase adsorbée sur une résine anionique. Application à l'hydrolyse de maltodextrines . . . 469
R. BERTIN, F. PIERRONNE, M. COMBARNOUS. — Détermination des paramètres de séchage de certains fruits compacts 489
J. BISSON, P. RIBÉREAU-GAYON. — Influence du cépage et du milieu sur la composition phénolique de cinq raisins noirs 827
H. BIZOT, J. L. MULTON. — Méthode de référence pour la mesure de l'activité de l'eau dans les produits alimentaires 441
A. BORIES, J. MAUGENET. — Modulation et influence du rejet d'eaux résiduaires d'une distillerie vinicole sur une station d'épuration urbaine 681
P. COUPLET, G. ALBAGNAC. — La digestion anaérobie. Application aux industries agro-alimentaires (*Revue bibliographique*) 533
R. DAMIDAUX, P. FEILLET. — Relation entre les propriétés viscoélastiques du gluten cuit, la teneur en protéines et la qualité culinaire des blés durs (*T. Durum*) 799
F. DELPEUCH, J. C. FAVIER, R. CHARBONNIÈRE. — Caractéristiques des amidons de plantes alimentaires tropicales 809
M. DEMAIMAY. — Méthode simplifiée d'analyse des dérivés silyles d'oximes de sucre par chromatographie en phase gazeuse. Application aux denrées alimentaires 455
J. P. DUMONT, J. ADDA. — Évolution des composées volatils soufrés au cours de la conservation de laits stérilisés U.H.T. 501
R. GOUTEFONGEA, C. VALIN. — Étude de la qualité des viandes de bovin. — II. Comparaison des caractéristiques organoleptiques des viandes de taurillon et d'animal adulte 609
B. LAIGNELET, R. ALARY. — Détermination des caractéristiques viscoélastiques du riz cuit à l'aide du viscoélastographe 783
M. LAROCHE. — Facteurs influençant les pertes d'eau pendant la cuisson de la viande (*Revue bibliographique*) 849
M. LAROCHE, A. LACOURT. — Influence du chlorure de sodium, du pH et du chauffage sur quelques propriétés de protéines de tournesol filées 767
B. MONTIES, J.-C. RAMBOURG. — Présence de flavonoïdes *sensu stricto* (Flavones et Coumestanes) dans des préparations de protéines extraites de luzerne (*Medicago sativa* var. Europe) 629
A. MOURANCHE, C. COSTES. — Mécanismes et enzymes dans la biosynthèse de la morphine (*Revue bibliographique*) 715
J. NICOLAS. — Effets de différents paramètres sur la destruction des pigments caroténoïdes de la farine de blé tendre au cours du pétrissage 695
B. POTTEAU, P. DUBOIS, J. RIGAUD. — Identification et dosage des acides monomères à structure cyclique hydrogénés obtenus à partir d'une huile de lin thermopolymérisée et d'une huile de lin oxydée thermiquement 655
J. RIVIÈRE, H. HESLOT, M. COUDERT, J. P. DELAGE. — Production de protéines microbiennes à partir de mouture de blé 585
F. SAUZE, M. GERVAIS. — Étude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées. II. — Décontamination bactérienne 509
M. SOUTY, Maryse REICH. — Effets de traitements technologiques (congélation et appertisation) sur certains constituants de l'arôme des pêches 837
RÉUNION DES CHERCHEURS EN VIANDE, PARIS, 13-14 décembre 1977, Résumés des communications 565

3e SYMPOSIUM INTERNATIONAL D'ŒNOLOGIE BORDEAUX 21-25 JUIN 1977

I. ALSAIDI. — *La vigne et le vin en Irak (intervention)* 27
S. P. AVAKIANTS. — *Les facteurs biochimiques de la formation de vins mousseux (intervention)* 185

A. BERTRAND. — *Influence du débourbage et de la température de fermentation sur les teneurs en substances volatiles des vins blancs (intervention)* 231
P. BIDAN, C. DUBOIS, G. DOUTSIAS. — Les problèmes théoriques et pratiques de la stabilisation biologique des vins par les procédés thermiques 293
J. N. BOIDRON. — *Relation entre les substances terpéniques et la qualité du raisin (Rôle de* Botrytis Cinerea) *(intervention)* 141
J. BRANAS. — Bases biologiques et agronomiques de la qualité des vendanges 99
Mlle D. CABEZUDO. — *Colonnes de phase mixte pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des fermentations alcoolique et acétique (intervention)* 421
C. CANTARELLI. — *La qualité des vins rouges issus du procédé de macération mécanique (intervention)* 257
F. A. COLACO DE ROSARIO. — *La caractérisation des vins, base essentielle de la délimitation des zones de production (intervention)* 377
A. COLAGRANDE, V. MAZZOLENI. — *Résidus de 2 imidazoline thione dans les moûts et les vins (intervention)* 395
D. DAVIDESCU. — *Teneur en oligoéléments des vins roumains en relation avec les zones écologiques (intervention)* 53
M. DEVEZE. — *Quelques problèmes de la stabilisation biologique des vins doux par la chaleur (intervention)* 315
F. DRAWERT, P. SCHREIER. — Caractérisation des raisins et des vins à l'aide de certains constituants remarquables 367
D. DUBOURDIEU. — *La production par* Botrytis Cinerea *d'un glucane responsable des difficultés de clarification de certains vins issus de raisins pourris (intervention)* 275
J. FARKAŠ. — Les agents de stabilisation biologique des vins 279
Y. GLORIES. — *Caractérisation des différentes fractions constitutives des composés phénoliques du vin rouge, leurs propriétés œnologiques (intervention)* 253
H. HAUSHOFER. — Élaboration et conservation des vins blancs aromatiques 221
R. HERNANDEZ. — *Relation entre les propriétés d'oxydation du moût et la qualité du vin de la Rioja (intervention)* 69
L. HIDALGO. — La pourriture des raisins. Moyens de protection et influence sur la qualité des vins 127
A. HUETZ DE LEMPS. — Les conditions de développement du vignoble de la Rioja (Espagne) 55
Mme S. LAFON. — *Les stéroïdes « facteurs de survie » des levures au cours de la vinification (intervention)* 215
C. LOINGER. — *Relations entre l'alimentation en eau de la vigne et la composition des moûts dans les vignobles israéliens (intervention)* 93
J. MADERO-TAMARGO, G. DARNE, J. BOUARD. — *Influence de l'irrigation sur la composition en acides gras et en composés phénoliques des mérithalles, des feuilles et des inflorescences de la vigne au moment de la floraison (intervention)* 123
Mme A. MANTACHIAN. — *Certains aspects du métabolisme de la proline par les levures du vin (intervention)* 219
G. MARGHERI. — Évolution de la couleur des vins au cours de leur conservation et de leur vieillissement 239
G. MARTEAU (†) présenté par R. CORDONNIER. — Maîtrise des activités enzymatiques au cours des phénomènes préfermentaires 161
P. MARTINIÈRE, M. GAULTIER, J. SEVERAC, P. SUDRAUD, J. L. CAUSSANEL. — *Détermination du millésime des vins en Gironde par la mesure de la radioactivité du carbone 14 (intervention)* 381
J. MASQUELIER. — *Sur la toxicité de l'acide 5-Nitrofurylacrylique (5 NFA) (intervention)* 291
J. MASQUELIER. — Vin et nutrition 427
A. M. MAYER. — Les oxydases des raisins et des vins 149
H. MÜLLER-SPATH. — *Un nouveau procédé de prévention des précipitations de bitartrate de potassium : « le procédé de contact » (intervention)* 333
H. P. OLMO. — Évolution des variétés cultivées pour la production de vin en Californie 15
J. G. OTT. — *Influence de la teinte du verre sur l'évolution du vin en bouteilles (intervention)* 235
E. PEYNAUD. — Les critères de la qualité des vins 337
R. PIJASSOU. — Les conditions historiques et géographiques de la naissance des grands crus au XVIIIe siècle 3
R. POUGET. — Le cépage et le porte-greffe, facteurs importants de la qualité des vins 111
J. PUISAIS. — Le contrôle organoleptique de la qualité : Techniques de dégustation 351
F. RADLER. — Les activateurs du développement anéarobie de la levure 203
B. C. RANKINE. — Acquisitions récentes dans la sélection et l'utilisation des souches de levures pures en œnologie 189

A. RAPP, H. HASTRICH. — *Application de la chromatographie en phase gazeuse à la caractérisation des variétés (intervention)* 423
P. RIBÉREAU-GAYON, Mme A. LONVAUD-FUNEL. — Le gaz carbonique dans les vins tranquilles, son incidence organoleptique 399
J. C. SAPIS. — *Modification du raisin parasité par* Botrytis Cinerea *et par différents microorganismes (intervention)* 137
J. F. SCHOPFER. — La rémanence des produits de traitement viticole antifongique et leur influence sur la vinification 383
G. SEGUIN. — L'alimentation en eau de la vigne et son influence sur la composition des moûts 81
E. SERPA PIMENTEL. — Le vignoble et le vin de Porto 31
L. SHCHERBANOVSKI. *Rôle des substances végétales comme agents de la stabilisation biologique des vins et des boissons (intervention)* 289
Mme S. SIKOVEC. — *Observations concernant l'incidence des levures sèches sur la qualité des vins (intervention)* 201
P. SUDRAUD. — *Évolution des taux d'acidité volatile depuis le début du siècle (intervention)* 349
S. C. TEODORESCU. — Les vignobles et les vins de Roumanie 41
L. USSEGLIO-TOMASSET. — Acquisitions récentes sur les phénomènes colloïdaux dans les vins 261
G. G. VALOUIKO. — Vignobles et vins d'U.R.S.S. 71
A. D. WEBB. — Application de la chromatographie en phase gazeuse au contrôle analytique des vins 411
K. WÜCHERPFENNIG. — Possibilité d'application de procédés utilisant des membranes pour la stabilisation des vins (ultrafiltration, osmose inverse, électrodialyse) 319
G. WÜRDIG. — La correction de l'acidité du moût et du vin 173

CONTENTS OF YEAR 1978

J. ADRIAN. —Vitamins in cereal products 873
C. ALAIS, G. HUMBERT, S. E. CHUON. — Bacteriological and biochemical studies on the A.T.A.D. process for the sterilization by friction of dairy, products. 739
M. BELLAL, J. BOUDRANT, C. CHEFTEL. — Tubular enzyme reactor using glucoamylase adsorbent onto an anionic resin. Application to maltodextrin hydrolisis. 469
R. BERTIN, F. PIERRONNE, M. COMBARNOUS. — Determination of drying parameters for some compact fruits 489
J. BISSON, P. RIBÉREAU-GAXON. — Variety and environnement influences ou black grapes phenolic compounds 827
H. BIZOT, J. L. MULTON. — A reference method for determination water activity in food 441
A. BORIES, J. MAUGENET. — Influence of discharching distillery waste water into urban sewage treatment plant 681
P. COUPLET, G. ALBAGNAC. — Anaerobic digestion. Its application to agronomic and food indiratries (*bibliographical review*). 533
R. DAMIDAUX, P. FEILLET. — Viscoelastic properties of cooked gluten, protein content and durum wheat cooking quality 799
F. DELPEUCH, J. C. FAVIER, R. CHARBONNIÈRE. — Characteristics of starches from tropical food plants 809
M. DEMAIMAY. — Simplified method to analyse the silyl derivatives of sugar oximes by gas liquid chromatography. Application to food analysis 455
J. P. DUMONT, J. ADDA. — Changes in volatile sulfur compounds in ultra-high temperature processed milks during aseptic storage. 501
R. GOUTEFONGEA, C. VALIN. — Study of bovine meat quality. — II. Comparison of the organoleptic properties of cow and young bull meat. 609
B. LAIGNELET, R. ALARY. — Viscoelastic characteristics determination of cooked rice with a viscoelastograph 783
M. LAROCHE. — Factors affecting water losses during cooking of meat (*Bibliographical review*) 849
M. LAROCHE, A. LACOURT. — Effect of NaCl, pH and temperature on some properties of spun sunflower proteins 767
B. MONTIES, J. C. RAMBOURG. — Occurence of flavonoïds (Flavones and Coumestanes) in alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe) leaf proteins · 629
A. MOURANCHE, C. COSTES. — Mechanisms and enzymes in morphine biosynthesis. A review (*Bibliographical review*) 715
J. NICOLAS. — Effects of some parameters on destruction of solt wheat flour carotenoïd pigments during mixing 695
B. POTTEAU, P. DUBOIS, J. RIGAUD. — G.L.C. — M.S. Characterization of C 18—saturated cyclic acids prepared from either thermally polymerized or thermally oxidized linseed oils 655
J. RIVIÈRE, H. HESLOT, M. COUDERT, J. P. DELAGE. — Protein production by micro-organisms from ground wheat 585
F. SAUZE, M. GERVAIS. — Study of the degradation speed cœfficient as a characteristic of the lagooned waste evolution. II. Bacterial decontamination 509
M. SOUTY, Maryse REICH. — Effects of processing treatments (freezing and canning) on certain peach aromatic substances 837
MEETING OF MEAT RESEARCH WORKERS. — Paris 13-14 december 1977. 565

3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ŒNOLOGIE BORDEAUX 1977 JUNE 21-25

I. ALSAIDI. *The vineyard and wine in Iraq.* (*Intervention*) 27
S. P. AVAKIANTS. — *The biochemical factors in the formation of sparkling wines.* (*Intervention*) 185
A. BERTRAND. — *Influence of debourbage and of fermentation temperature on the volatile tenor of white wines.* (*Intervention*) 231

P. Bidan, C. Dubois, G. Doutsias. — Theoretical and practical difficulties of the wine biological stabilization with heat treatments 293
J. N. Boidron. — *Relation between terpenic substances and the grapes quality (role of* Botrytis cinerea) (*Intervention*) 141
J. Branas. — Biological and agronomical date for the quality of grape larvest 99
Mlle D. Cabezudo. — *Mixed phase column in analysis by gas chromatography of alcoholic and acetic fermentation products.* (*Intervention*) 421
C. Cantarelli. — *The quality of red wine produced by mechanical maceration.* (*Intervention* 257
F. A. Colaco de Rosario. — *The wine characterization as essentiel basis of delimiting production zones* (*Intervention*) 377
O. Colagrande, V. Mazzoleni. — *Residues of 2 imidazolidine thione in the wine musts* (*Intervention*) 395
D. Davidescu. — *Percentage of oligoelements in Rumanian wines in different ecological zones* (*Intervention*) 353
M. Deveze. — *Some problems of the biological stabilization of sweet win by heat* 315
F. Drawert, P. Schreier. — Characterization of the grapes and wines by certain typical fractions 367
D. Dubourdieu. — *Botrytis cinerea as a producer of a glucane responsible of the clarification difficulties in certain wines made of rotten grapes* (*Intervention*) 275
J. Farkaš. — Wine biological stabilizers 279
Y. Glories. — *Characterization of the different constituent fractions of the phenoloc components of red wine. Their œnological properties* (*Intervention*) 253
H. Haushofer. — Production and conservation of the aromatic white wines 221
R. Hernandez. — *Relation between the capacity of oxydation of must and the quality of Rioja wine* (*Intervention*) 69
L. Hidalgo. — Grape rot: control means and influence on the wine characteristics . . . 127
A. Huetz de Lemps. — The conditions for the Rioja Spain vineyard development 55
Mrs S. Lafon. — *The steroids as survival factors of yeasts during vinification* (*Intervention*) 215
C. Loinger. — *Relations between the water supply to the vineyard and the composition of must in Israelian vineyards* (*Intervention*) 93
J. Madero-Tamargo, G. Darne, J. Bouard. — *Irrigation and its influence on the fat acids and phenolic components composition of the internodes the leafs and inflorescences of vine during efflorescence* (*Intervention*) 123
Mrs A. Mantachian. — Some asoects of prolin metabolism by wine yeast 219
G. Margheri. — Evolution of the wine colour during conservation and ageing 239
G. Marteau (†). — Control of enzyme activity during the prefermentation phase 161
P. Martinière, M. Gaultier, J. Severac, P. Sudraud, J. L. Caussanel. — *Determination of the vintage of the Gironde wines by measure of the carbon 14 radioactivity* (*Intervention*) 381
J. Masquelier. — *The toxicity of 5-NFA* (*Intervention*) 291
J. Masquelier. — Wine and nutrition 427
A. M. Mayer. — Grape and wine oxidases 149
H. Müller-Spath. — *A new procedure to prevent precipitations of potassium acta tartrate, the contact procedure* (*Intervention*) 333
H. P. Olmo. — Evolution of cultivated wine varieties in California 15
J. G. Ott. — *Influence of the glass colour on the wine evolution in the bottle* (*Intervention*) . . 235
E. Peynaud. — The criteria of the quality of wine 337
R. Pijassou. — Historical and geographical conditions of the rise of the « Grands crus » in the eighteenth century 3
R. Pouget. — Vine variety and rootstock as major factors of the wine quality 111
J. Puisais. — The organoleptic quality control: techniques and tasting 351
F. Radler. — Promotors of the yeast anaerobic growtk 203
B. C. Rankine. — Progress in the selection and use of pure yeasts in œnology 189
A. Rapp, H. Hastrich. — *Application of gas chromatography to the characterization of the different varieties* (*Intervention*) 423
P. Ribereau-Gayon, Mrs A. Lonvaud-Funel. — Carbon dioxide in wine and its organoleptic incidence 399
J. C. Sapis. — Modification of grapes affected by Botrytis cinerea and by different microorganisms 137
J. F. Schopfer. — The remanence of fungicides and their influence on vinification 383
G. Seguin. — The water intake system of the vine and its influence on the chemical composition of the musts 81
E. Serpa-Pimentel. — The Porto vineyard and wines 31

L. SHCHERBANOVSKI. — *The role of vegetable substances in the biological stabilization of wine and other drinks (Intervention)* 289
Mrs S. SIKOVEC. — *Observations concerning the incidence of dry yeasts on the wine quality (Intervention)* 201
P. SUDRAUD. — *Evolution of the volatile acid ratio since the beginning of this century (Intervention)* 349
S. C. TEODORESCU. — The Rumanian vineyards and wines. 41
L. USSEGLIO-TOMASSET. — *Progress about colloidal phenomenons occuring in musts and wines (Intervention)* 261
G. G. VALOUIKO. — Vineyards and wines of the U.S.S.R.. 71
A. D. WEBB. — The application of gas chromatography on the analytical control of wine 411
K. WÜCHERPFENNIG. — Possible applications of procedures utilizine membranes for the stabilization of wines (ultra filtration, inverse osmosis, electrodialysis). 319
G. WÜRDIG. — Correction of the must and wine acidity level. 173

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7 avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire:* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de...; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé:* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion et conclusion;* f) *titre et résumé* anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles: le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C.N.R.S.;* le volume; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages: le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; le nom de l'éditeur; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts, » le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I.N.R.A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies: Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit: M. BOURDET, Laboratoire de Technologie des Blés, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris, ou M. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves: les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à M. BOURDET.

TECHNOLOGIE AGRICOLE.

Le Directeur de la publication: M.-L. Cagnac

FD Imprimerie Alençonnaise, rue Édouard Belin, 61002 Alençon

Dépôt légal: 4e trimestre 1978. N° d'impression: 90.405

CPPAP n° 26.018